

**Funktionelle Aspekte der Langzeit-Potenzierung
der synaptischen Übertragung in
hippocampalen Hirnschnitten**

**Eine Untersuchung mittels orts- und zeitaufgelöster
optischer Erfassung der neuronalen Aktivität**

Peter Saggau

1989

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0101

Aus dem Physiologischen Institut der
Universität München
Vorstände: Prof. Dr. med. Klaus Thureau,
Prof. Dr. med. Eckehart Gerlach,
Prof. Dr. med. Gerrit ten Bruggencate

**Funktionelle Aspekte der Langzeit-Potenzierung
der synaptischen Übertragung in hippocampalen Hirnschnitten.
Eine Untersuchung mittels orts- und zeitaufgelöster
optischer Erfassung der neuronalen Aktivität**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von
Peter Saggau
aus
Brannenburg am Inn

1989

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Büttner

Prof. Dr. W. Waidelich

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 05. 1989

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1. Prinzipien elektrischer und optischer Verfahren	4
1.2. Funktionelle Anatomie des Hippocampus	7
1.3. Langzeit-Potenzierung der synaptischen Übertragung	12
1.4. Aufgabenstellung	16
2. Methode	18
2.1. Präparate	18
2.2. Konventionelle elektrophysiologische Stimulation und Ableitung	21
2.3. Optische Ableitung	23
2.4. Aufnahme, Verarbeitung und Darstellung der Versuchsdaten	29
3. Ergebnisse	32
3.1. Registrierungen an Ganglienpräparaten	32
3.2. Registrierungen am hippocampalen Schnittpräparat	38
3.3. Optische Detektion von Langzeit-Effekten	46
4. Diskussion	52
4.1. Eignung des optischen Verfahrens für Fragestellungen der experimentellen Neurophysiologie	55
4.2. Interpretation der optischen Signale am hippocampalen Schnittpräparat	64
4.3. Untersuchung funktioneller LTP-Effekte	65
4.4. Grenzen und Perspektive des Verfahrens	66
4.5. Erreichte Ergebnisse und weiterführende Fragestellungen	72
Literatur	75
Danksagung, Lebensdaten	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Grundprinzip der elektrischen u. optischen Detektion neuronaler Aktivität	6
Abb. 2:	Darstellung der anatomischen Strukturen des Hippocampus	10
Abb. 3:	Synaptische Verschaltungen im Hippocampus	11
Abb. 4:	Epifluoreszenz-Einrichtung zur optischen Detektion neuronaler Aktivität mit zusätzlicher konventioneller Mikroelektroden-Kontrollableitung	26
Abb. 5:	Epifluoreszenz-Einrichtung zur orts aufgelösten optischen Erfassung neuronaler Aktivität	28
Abb. 6:	Segmental-Ganglion des Blutegeles	35
Abb. 7:	Ganglion cervicale superior (SCG) der Ratte	37
Abb. 8:	Vergleich von optischen und elektrischen Signalen am hippocampalen Hirnschnitt	40
Abb. 9:	Effekte von Ca^{2+} -freier und TTX-haltiger Lösung auf orthodrom evozierte Potentiale in der CA1-Region	43
Abb. 10:	Erregungsausbreitung nach orthodromer Stimulation	45
Abb. 11:	Klassische LTP der CA1-Population	47
Abb. 12:	Homosynaptische LTPs der CA1-Population	51
Abb. 13:	Proportionalität der optischen Signale	57
Abb. 14:	Epifluoreszenz-Einrichtung zur optischen Erfassung neuronaler Aktivität mittels Objektabtastrung	69

Zusammenfassung

1. Es wird eine nichtinvasive Methode vorgestellt, die mit Hilfe eines elektro-optischen Transformations-Prozesses die elektrischen Phänomene der neuronalen Aktivität in Lichtsignale umwandelt. Diese Methode ist den klassischen elektrophysiologischen Verfahren in vielen Aspekten überlegen.
2. Eine Möglichkeit dieser optischen Methode, die Messung potential-sensitiver extrinsischer Fluoreszenz, wurde an Testpräparaten eingeführt und am hippocampalen Schnittpräparat erstmals erfolgreich eingesetzt.
3. In Neuronen-Populationen wurde die Erregungsausbreitung nach orthodromer Stimulation demonstriert. Die erreichte räumliche und zeitliche Auflösung des Verfahrens erlaubte die Differenzierung prä- und postsynaptischer Signale.
4. Klassische Langzeit-Potenzierungen wurden optisch erfaßt und durch elektrische Kontrollableitungen verifiziert. Die Langzeit-Stabilität dieser Technik ermöglichte die Untersuchung langanhaltender Änderungen von Synapsenfunktionen.
5. Homosynaptische Langzeit-Potenzierungen wurden durch tetanische Stimulation unabhängiger, afferenter Bahnen induziert und optisch lokalisiert. Diese Effekte werden als Modell eines elementaren, nicht-assoziativen Lernvorganges und somit als funktionelle Langzeit-Potenzierungen angesehen.

6. Das verwendete optische Verfahren erscheint als eine aussichtsreiche Methode zur Untersuchung funktioneller Langzeit-Potenzierungen in Neuronenpopulationen. Es vereint Nicht-Invasivität, Orts- und Zeitauflösung sowie Langzeit-Stabilität in sich.

1. Einleitung

Lernen und Gedächtnis sind Voraussetzungen dafür, daß Erfolge gezielt wiederholt und Mißerfolge vermieden werden können. Störungen von Lernvorgängen und Gedächtnis haben daher eine zentrale Bedeutung in der Medizin. Die experimentelle Psychologie ist in der Lage, instrumentelles und klassisch-assoziatives Lernen sowie Gedächtnisleistungen quantitativ zu erfassen (z. Überblick s. Rosenzweig und Leimann, 1982). Die zugrundeliegenden Vorgänge im Zentralnervensystem (ZNS) von höherentwickelten Organismen befinden sich jedoch trotz intensiver Bemühungen der letzten Zeit immer noch im Dunkeln.

Als eine mögliche Basis von Lernen und Gedächtnis werden Änderungen der Übertragungseigenschaften von Synapsen angesehen. In verschiedenen Strukturen des limbischen Systems (z. Überblick s. MacLean, 1970), insbesondere des Hippocampus, wurden derartige Effekte vermutet und gefunden (z. Überblick s. Teyler und DiScenna, 1985). Experimentell ist es möglich, Stunden bis Tage anhaltende Potenzierungen der synaptischen Transmission (Langzeit-Potenzierung, LTP) durch kurzdauernde (Sekunden-Bereich) tetanische Aktivierung afferenter Bahnen auszulösen. Auf zellulärer und subzellulärer Ebene sind manche diesen Phänomenen zugrundeliegende Mechanismen durch Ableitung von Einzelzellen und Untersuchung von Membranteilen aufgeklärt (z. Überblick s. Bilkey und Goddard, 1986; Teyler und DiScenna, 1987). Andererseits ist die funktionelle Bedeutung dieses Phänomens bisher noch wenig gut verstanden. Insbesondere bei komplexen Nervensystemen ist es zum Teil wohl darauf zurückzuführen, daß klassische elektrophysiologische Techniken bei der Untersuchung von Neuronen-Populationen meist summierte Aktivitäten liefern und daher nur wenig aussagekräftig sind. Dies gilt auch für moderne Verfahren, wie die direkte Registrierung evozierter Potentiale mit Mehrfach-Elektroden (z. Überblick s. Novak und Wheeler, 1988) oder die Analyse der Stromquellen-Dichte (z. Überblick s. Mitzdorf, 1985).

Die Einführung optischer Verfahren zur Messung neuronaler Aktivität, z.B. Entladungsmuster, öffnet völlig neue Aspekte. In der Tat scheint es jetzt möglich zu sein, mit neuartigen photometrischen Technologien das elektrophysiologische Verhalten von Nervenzell-Populationen zu beobachten. Mit solchen Verfahren könnte die funktionelle Bedeutung der Langzeit-Potenzierung untersucht werden, da hier die neuronale Aktivität mit ausreichender Orts- und Zeitauflösung langfristig und darüber hinaus nichtinvasiv registriert werden kann.

1.1. Prinzipien elektrischer und optischer Verfahren

Die klassische Elektrophysiologie beobachtet neuronale Aktivität mit Hilfe direkter Messungen von elektrischen Potentialdifferenzen. Hierzu verwendet sie verschiedenartige Elektroden, beispielsweise Mikroelektroden mit Spitzendurchmessern zwischen $0,1 - 5 \mu\text{m}$. Diese Elektroden werden je nach Fragestellung außerhalb oder innerhalb der Nervenzellen plaziert (extra- oder intrazelluläre Ableitung). Mit **extrazellulären** Ableitungen ist es möglich, Nervenzell-Aktivität in Form von elektrischen Feldpotentialen darzustellen. Feldpotentiale entstehen durch lokal überlagerte Ausgleichsströme, die durch den Extrazellulärraum fließen. Mit **intrazellulären** Ableitungen kann das lokale transmembranale Potential einer einzelnen Zelle und seine zeitlichen Änderungen registriert werden. Bei diesem Verfahren besteht jedoch die Gefahr, daß wichtige Zellparameter (z.B. Membranwiderstand, intrazelluläres Ionenmilieu etc.) durch die Penetration der Membran verändert werden. Zudem ist es praktisch unmöglich, simultan intrazellulär von nennenswert großer Zahl von Neuronen abzuleiten.

Die **optische Detektion** neuronaler Aktivität stellt hierzu eine nichtinvasive Alternative dar. Die Grundlage dieses Verfahrens sind elektro-optische Transformations- Prozesse, die es ermöglichen, lokale transmembranale Potentialänderungen optisch zu erfassen. Dazu werden potentialabhängige Änderungen optischer Parameter wie Transmission oder Fluoreszenz bei monochromatischer Beleuchtung des Präparates photometrisch detektiert. Solche optischen Änderungen sind z.T. als gegebene Präparat-Eigenschaften beobachtbar (intrinsische optische Effekte). Das methodische Ziel der Äquivalenz von optischen und elektrischen Signalen ist bislang jedoch nur erreichbar, wenn die Membranen mit potential-sensitiven Farbstoffen beladen werden (extrinsische optische Effekte, z. Überblick s. Cohen et al., 1978; Cohen und Salzberg, 1974; Grinvald, 1985; Salzberg, 1983). In **Abb. 1** ist das Grundprinzip der Methode für elektrische und optische Ableitungen vergleichend dargestellt.



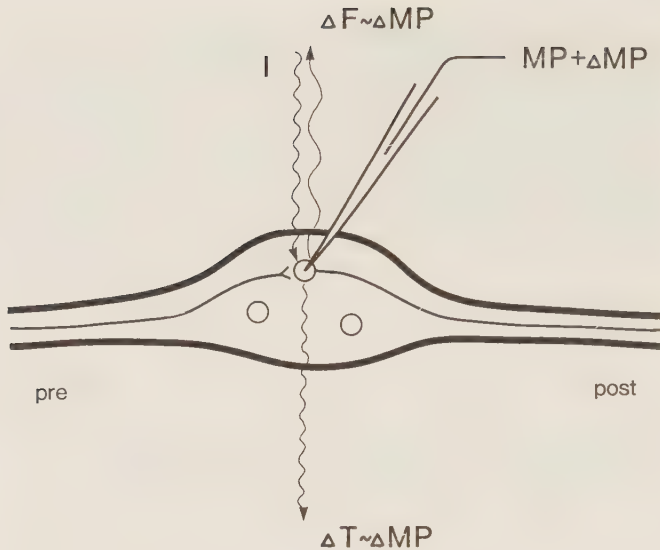


Abb. 1: Grundprinzip der elektrischen und optischen Detektion neuronaler Aktivität

Die konventionelle elektrophysiologische Methode mißt die transmembranale Potential-Differenz zwischen einer intrazellulären Mikroelektrode und einer indifferenten Badelektrode (nicht dargestellt). Dieses Potential ist zusammengesetzt aus einem statischen Anteil MP und einem dynamischen Anteil ΔMP . Bei der optischen Methode dagegen werden die interessierenden neuronalen Strukturen mit monochromatischem Licht der Intensität I beleuchtet und membranpotentialkorrelierte Änderungen der Transmission $\Delta T \sim \Delta MP$ bzw. der Fluoreszenz $\Delta F \sim \Delta MP$ detektiert. Schematisches Ganglienpräparat, Kreise symbolisieren einzelne Neurone.

Abkürzungen: pre: präganglionär
post: postganglionär

Neben der Nichtinvasivität ist die Möglichkeit, lokale transmembranale Potentialänderungen zu detektieren, der wohl wesentlichste Vorteil der hier beschriebenen optischen Verfahren gegenüber den klassischen elektro-physiologischen Methoden. Dies ermöglicht über die übliche zeitaufgelöste Detektion der neuronalen Aktivität hinaus gleichzeitig die ortsauflöste Registrierung. Die elektrischen Phänomene der interessierenden Präparatstrukturen können demzufolge durch Ausblendung der nicht interessierenden **optisch** selektiert werden. Theoretisch ist diese Ortsauflösung nur durch die Wellenlänge des verwendeten Lichtes limitiert.

- Ortsaufgelöste optische Verfahren

Es bestehen zwei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten, nämlich Bild- und Objektabtastung, um örtlich und zeitlich veränderliche optische Parameter eines Objektes zu registrieren. Bei der **Bildab-tastung** wird das zu untersuchende Objekt bei räumlich homogener "Flut-Beleuchtung" auf einem ortsauflösenden Detektor optisch abgebildet (z.B. Fernsehkamera), dort in einzelne Punkte zerlegt und deren zeitliche Änderungen beobachtet. Dagegen wird bei der **Objekt-abtastung** das Objekt räumlich inhomogen beleuchtet, d.h. mit einem einzelnen Lichtpunkt systematisch abgetastet, während es auf einem nicht-ortsauflösenden Detektor (z.B. Photodiode) abgebildet wird.

1.2. Funktionelle Anatomie des Hippocampus

Diese unter dem Neocortex befindliche Gehirnstruktur hat auf Grund ihrer ausgeprägten makroskopischen Anatomie schon früh die deskriptiven Anatomen zur Namensgebung Hippocampus (Seepferdchen), manchmal auch Ammonshorn (Cornu Ammonis), angeregt. Die bilateral symmetrische Struktur gehört zum limbischen System (z. Überblick s. MacLean, 1970), welches phylogenetisch alte Anteile des Telencephalon umfaßt.

Die mikroskopische Anatomie des Hippocampus wurde zunächst von Ramón y Cajal beschrieben und später von Lorente de Nó auf Grund extensiver Golgi-Studien in detaillierter Form publiziert (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1934). **Abb. 2** gibt einen Überblick über die anatomische Lage und die Anordnung der verschiedenen Zellpopulationen, zusätzlich sind in **Abb. 3** ohne Berücksichtigung lokaler Netzwerke die synaptischen Verbindungen der wichtigsten Neuronen-Populationen (Prinzipalzellen) schematisch dargestellt. Es handelt sich hierbei im wesentlichen um eine trisynaptische, exzitatorische Verschaltung. Der Eingang erfolgt von peri- und entorhinalen Gebieten (Area perirhinalis, PERI; Area entorhinalis, ENTO) über die afferenten Fasern des Tractus perforans (PP), welche auf den Dendriten der Körnerzellen (G) des Gyrus dentatus (DG) enden. Die Axone dieser Körnerzellen (Moosfasern, Mf) bilden synaptische Kontakte mit den Dendriten der CA3-Pyramidenzellen des Hippocampus proper. Die als Schaffer-Kollateralen bezeichneten Axone der Population der CA3-Pyramidenzellen enden schließlich auf den apikalen Dendriten der CA1- Pyramidenzellen, deren Axone über den Alveus (Alv) zum subiculären Komplex hin (SUBIC) die hippocampale Formation verlassen.

Die funktionelle Anatomie des Hippocampus hat zahlreiche Untersuchungen veranlaßt, diese Formation insbesondere für Fragestellungen der allgemeinen Neurobiologie heranzuziehen. Die Organisationsprinzipien sind einfacher als im Neocortex: der Hippocampus besitzt eine klare Stratifikation; zudem sind afferente Fasern von den efferenten Strukturen weitgehend getrennt (z. Überblick s. Brodal, 1981; Isaacson, 1982; Teyler und DiScenna, 1984). Eine zusätzliche Eigenschaft erhöht die Attraktivität dieser Formation: die einfache Möglichkeit Schnittpräparate herzustellen. Der hippocampale Hirnschnitt wurde erstmals von Yamamoto beschrieben (Yamamoto und McIlwain 1966). Mittlerweile gewonnene eingehende Kenntnisse auf elektrophysiologischem, biochemischem und pharmakologi-

schem Sektor machten es zu einer Standard-Präparation des ZNS (z. Überblick s. Dingledine, 1984).

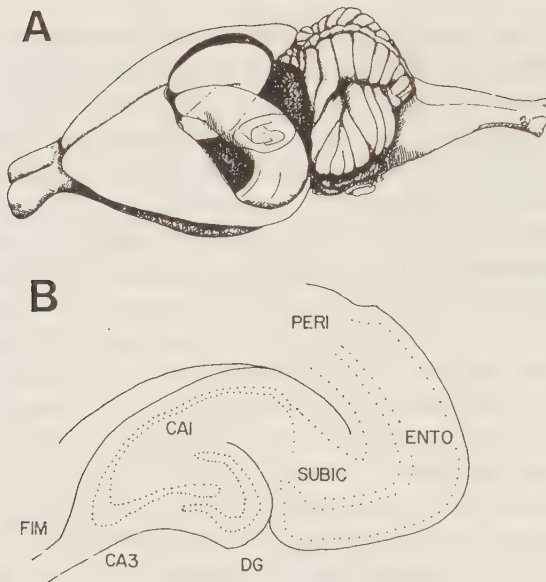


Abb. 2: Darstellung der anatomischen Strukturen des Hippocampus
(nach Teyler und DiScenna, 1984)

- A:** Schema der makroskopischen Beziehungen. Die überlagernden neocortikalen Areale sind entfernt, so daß die bilateral symmetrische Struktur exponiert ist. Angedeutet ist ein Transversalschnitt mit den interdigitierenden Prinzipalzell-Schichten.
- B:** Schematischer Transversalschnitt. Die Prinzipalzell-Schichten sind durch gepunktete Linien begrenzt.

Abkürzungen: CA1: Prinzipalzell-Region Cornu Ammonis 1
CA3: Cornu Ammonis 3
DG: Gyrus dentatus
ENTO: Area entorhinalis
FIM: Fimbria
PERI: Area perirhinalis
SUBIC: subiculärer Komplex

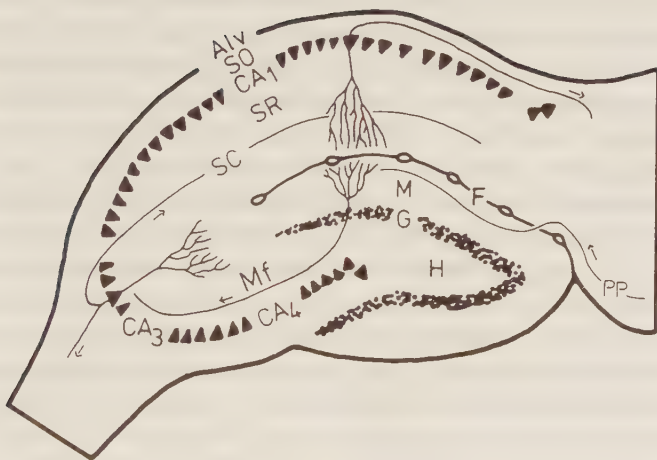


Abb. 3: Synaptische Verschaltungen im Hippocampus

Abkürzungen:	Alv: Alveus
	CA1-4: Prinzipalzell-Region Cornu Ammonis 1-4
	G: Körnerzellen (Granule cells)
	Mf: Mossfasern
	PP: Tractus perforans (Perforant pathway)
	SC: Schaffer-Kollaterale
	SO: Stratum oriens
	SR: Stratum radiatum

1.3. Langzeit-Potenzierung der synaptischen Übertragung

Zu Beginn der Einleitung wurde schon darauf hingewiesen, daß Änderungen der synaptischen Übertragung möglicherweise eine Grundlage von Lernen und Gedächtnis bilden könnten. Früh schon wurde postuliert, daß langanhaltende Potenzierungen der Übertragungseigenschaften neuronaler Synapsen existierten und vor allem benutzungsabhängig seien (Hebb, 1949; Eccles, 1964; Marr, 1968). Gemäß dieser Hypothese sollten die neuronalen Übertragungsstellen in Abhängigkeit des räumlich-zeitlichen Zusammentreffens von prä- und/oder postsynaptischer Aktivität plastisch verändert werden. In der letzten Dekade wurde ein entsprechendes neurophysiologisches Phänomen erstmals experimentell am Hippocampus in-vivo demonstriert (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss und Lømo, 1973) und anschließend in dieser Formation intensiv untersucht (Alger und Teyler, 1976; Andersen et al., 1977; Schwartzkroin und Wester, 1975). Darüber hinaus konnte dieser Effekt in anderen Arealen des zentralen Nervensystems (Neocortex, entorhinaler und piriformer Cortex) und des peripheren Nervensystems (Ganglion cervicale superior, Ganglien des autonomen Nervensystems) gezeigt werden (z. Überblick s. Teyler und DiScenna, 1987; Tsukahara, 1981).

Unter experimentellen Bedingungen kommt es während und nach periodischen Stimulationen der Afferenzen an meist monosynaptischen Verbindungen des ZNS zu fasilitierenden Reaktionen unterschiedlicher Dauer (Alger und Teyler, 1976; Dunwiddie und Lynch, 1978). Diese Effekte werden in Abhängigkeit von angewendeter Reizfrequenz und Dauer der beobachteten Reaktionen entweder als Frequenz-Potenzierung, als posttetanische Potenzierung oder als Langzeit-Potenzierung bezeichnet.

Bei Stimulationsfrequenzen im Sekunden-Takt ist nur während oder kurz nach der Reizung (Sekunden-Bereich) eine als **Frequenz-Potenzierung** bekannte Änderung des Antwortverhaltens zu beobachten (Creager et al.,

1980; Landgren et al., 1962; Lømo, 1970). Die vergrößerte Antwort pro Einzelreiz ist hier vermutlich nur auf eine vermehrte TransmitterAusschüttung zurückzuführen. Bei geringfügig höheren Stimulationsfrequenzen treten ähnliche, transiente Phänomene mit jedoch deutlich erhöhter Potenzierungsdauer im Minuten-Bereich auf (**posttetanische Potenzierung**, Curtis et al., 1960; Lloyd, 1949). Erst bei Stimulationsfrequenzen von 10 - 100 Hz sind, oft nach vorübergehender Phase stark reduzierter Aktivität (posttetanische Depression), **Langzeit- Potenzierungen** (LTPs) zu beobachten. Bei Säugtieren ist dieser LTP-Effekt an synaptischen Strukturen des Hippocampus besonders gut untersucht (z. Überblick s. Swanson et al., 1982; Teyler und DiScenna, 1985). An diesem Präparat wurde auch der erste Potenzierungseffekt an Körnerzellen des Gyrus dentatus beschrieben nach Tetanisierung des Tractus perforans (Bliss und Gardner-Medwin, 1973; Bliss und Lømo, 1973). Die hierbei verwendeten Tetanisierungs- Parameter waren Reizfrequenzen von 10 - 15 Hz für jeweils 1 - 9 s Dauer.

Als eine mögliche Erklärung des LTP-Effektes wurden sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen vorgeschlagen: zum einen die vermehrte präsynaptische Freisetzung des erregenden Neurotransmitters Glutamat (Lynch et al. 1985), zum anderen eine postsynaptische Zunahme der Glutamat-Rezeptor-Bindung (Eccles, 1983; Siman et al., 1985). Neuere Befunde sprechen für die Beteiligung eines zusätzlichen Rezeptortyps für erregende Aminosäuren, der experimentell erst bei höheren Stimulationsfrequenzen und der damit verbundenen vermehrten postsynaptischen Depolarisation aktivierbar ist. Mit diesem Glutamat-Rezeptor, der weder Qisqualat- noch Kainat-, jedoch N-Methyl-D-Aspartat- sensitiv ist (NMDA-Rezeptor), erscheinen auch die anderen beobachteten Potenzierungsarten erklärbar (z. Überblick s. Collingridge und Bliss, 1987).

Als Folge tetanischer Stimulation sind im Hippocampus an verschiedenen Prinzipalzell-Populationen unterschiedliche LTP-Effekte beschrieben worden, die unter funktionellen Aspekten als homo- bzw.

heterosynaptisch bezeichnet werden. Langzeit-Potenzierungen, welche auf die tetanisierten Synapsen selbst beschränkt sind, erscheinen als geeignete Kandidaten für elementare Lernvorgänge. Hier ist posttetanisch ein direkter räumlicher Bezug zwischen Reiz- und LTP-Muster möglich. Diese **homosynaptischen Potenzierungen** wurden in hippocampalen Hirnschnitt-Präparaten hauptsächlich an CA1-Pyramidenzellen beobachtet (Andersen et al., 1980; Dunwiddie und Lynch, 1978; Wigström und Gustafsson, 1983). LTP-Effekte, welche dagegen nicht nur auf die tetanisierten Synapsen selbst beschränkt sind, wurden in diesen Präparaten hauptsächlich bei CA3-Pyramidenzellen gefunden (Misgeld et al., 1979; Yamamoto und Chujo, 1978). Die Bedeutung dieser **heterosynaptischen Effekte** ist bislang unklar.

- Funktionelle Bedeutung der LTP-Effekte

In neurobiologischer Hinsicht könnten LTP-Effekte, wie erwähnt, Grundlage der Lern- und Gedächtnisfähigkeit des ZNS sein. Mit dieser Hypothese beschäftigen sich demzufolge viele experimentelle und modellierende Untersuchungen auf unterschiedlichen Ebenen des ZNS (z. Überblick s. Swanson et al., 1982; Teyler und Discenna, 1985; Thompson et al., 1983). Erstmal scheint ein durchgängiges Modell von Funktions- und Strukturänderungen im ZNS gefunden zu sein, das sowohl in-vivo als auch in-vitro beobachtbar ist (Disterhoft et al., 1986; Wenzel et al., 1986).

Das Forschungs-Interesse zielt auf die funktionelle Bedeutung, die langanhaltende Änderungen der synaptischen Übertragung haben. Ein Ansatz versucht, diese Fragestellung anhand einfacher Nervensysteme von Invertebraten und deren wenigen, hochspezialisierten Neuronen zu beantworten (z. Überblick s. Kandel und Spencer, 1968). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit diese Fragestellung an komplexen Nervensystemen von Säugetieren untersucht. Da die Elemente solcher großen Nervenzell-Populationen

unspezialisiert sind, kann der Beitrag eines einzelnen Neurons zum System-Verhalten nur schwer interpretiert werden. Entsprechendes gilt hier auch für die funktionelle Bedeutung der individuellen Langzeit- Potenzierbarkeit von Neuronen. Der Erfolg des "Lernvorganges" ist deshalb auch nur in der **räumlichen** Korrelation von **Reiz- und LTP-Muster** zu suchen. Die durch orts aufgelöste optische Ableitung demonstrierte Homosynaptizität der plastischen Veränderungen verdeutlicht die mögliche funktionelle Bedeutung der LTP- Effekte in der untersuchten zentralen Neuronenpopulation (CA1). Bei solchen homosynaptischen Langzeit-Veränderungen ist der räumliche Bezug zwischen Reiz- und LTP-Muster offensichtlich.

Kürzlich konnte an dem verwendeten Präparat gezeigt werden, daß die übliche tetanische Stimulation durch ein natürlicheres Stimulations-Muster ersetzt werden kann (Rose, 1988). Dieses besteht aus einem bahnenden Reiz (priming pulse), gefolgt von einer kurzen Reiz-Salve (primed burst). Dieses Stimulations-Muster hat innerhalb eines bestimmten Zeitfensters zu erfolgen, dessen Optimum bei ca. 160 ms lag, d.h. im Bereich des Theta-Bandes des EEGs (ca. 6 Hz). Darüber hinaus wurden von mehreren Arbeitsgruppen langanhaltende Modulationen des Übertragungsverhaltens demonstriert, die nur bei zeitlich korrelierter Stimulation von mindestens zwei unabhängigen Afferenzen auftreten (Barrionuevo und Brown, 1983; Ito et al., 1986; Kelso und Brown, 1986; Kelso et al., 1986; Sastry et al., 1986). Diese sogenannten "assoziativen" LTP-Effekte verstärken die hypothetische funktionelle Bedeutung der Langzeit-Potenzierung der synaptischen Übertragung. Dadurch wird es möglich, die Fragestellungen der klassischen Konditionierung an Säugetier-Neuronenpopulationen in-vitro zu studieren (z. Überblick s. Kandel und Spencer, 1968; Pawlow, 1927).

1.4. Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, Langzeit-Potenzierungen der synaptischen Plastizität mit einer neu zu entwickelnden, nichtinvasiven optischen Methode auf funktionelle Aspekte zu überprüfen. In einem schrittweisen Vorgehen sollte diese Aufgabe erfüllt werden. Zunächst sollte ein geeignetes optisches Verfahren entwickelt werden, dessen Eignung für die experimentelle Neurophysiologie überprüft wurde. Schließlich sollte es zur Untersuchung funktioneller Aspekte der Langzeit-Potenzierung angewendet werden.

- Entwicklung des optischen Verfahrens

Es war zunächst erforderlich, eine geeignete Methode zu entwickeln, die es gestattete, elektrische Phänomene an neuronalen Membranen in Lichtsignale umzuwandeln und photometrisch zu detektieren. Die elektro-optische Transformation sollte durch die Anwendung potentialsensitiver Substanzen erreicht werden. Die optischen Signale sollten über einem bestimmten Areal des Präparates orts- und zeitaufgelöst erfaßt werden. Hierzu mußten zunächst photometrisches und elektronisches Gerät sowie Datenerfassungs- und -verarbeitungs-Programme entwickelt werden.

- Überprüfung der Eignung für die experimentelle Neurophysiologie

An Ganglien-Präparaten sollten zunächst grundsätzliche Fragen zur Äquivalenz der optischen gegenüber der klassischen elektrischen Registrierung auf Einzelzell-Ebene überprüft werden. Zudem waren die verwendeten potentialsensitiven Substanzen auf ihre Stabilität und ihre Toxizität zu untersuchen. Die Kurz- und Langzeit-Stabilität des speziell

entwickelten photometrischen und elektronischen Gerätes mußte ebenso gewährleistet sein.

- Anwendung für die Untersuchung funktioneller Aspekte der Langzeit-Potenzierung

An hippocampalen Hirnschnitt-Präparaten sollten die detektierten optischen Signale auf der Ebene von Neuronen- Populationen funktionell interpretiert werden. Hierzu waren ortsauflösende Messungen nötig. Die Beobachtung reizinduzierter, langanhaltender Potenzierungen der synaptischen Übertragung (LTP) verlangte die entsprechende Langzeit-Stabilität des Verfahrens. Schließlich sollte untersucht werden, ob lokale LTP-Effekte durch geeignete räumliche Reizmuster induziert und mit der funktionellen Anatomie des Präparates korreliert werden können.

2. Methode

2.1. Präparate

- Ganglienpräparate

Das optische Verfahren der Registrierung neuronaler Aktivität mittels potentialsensitiver Fluoreszenz (s. 1.1.) wurde zunächst an hierfür besonders geeigneten in-vitro-Ganglienpräparaten eingeführt und überprüft. Voraussetzung dafür war zum einen eine gute mikroskopische Visualisierung oberflächlicher Neurone, welche nicht durch Neuropil überdeckt waren, zum anderen wurden Neurone ausreichender Größe für konventionelle, stabile, intrazelluläre Kontrollableitungen benötigt. Demzufolge wurden als Invertebraten-Päparat das Segmental-Ganglion des Blutegels sowie als Säugetier-Päparat das Ganglion cervicale superior der Ratte benutzt.

- Segmental-Ganglien des Blutegels (*Hirudo medicinalis*)

Ganglien wurden aus getöteten Blutegeln nach der Eröffnung der ventralen Seite entnommen (Muller et al., 1981) und in Blutegel-Ringerlösung bei 15°C gehalten. Diese Lösung war wie folgt zusammengesetzt (in mmol/l): NaCl 115; KCl 4; CaCl₂ 1,8; Tris maleate 10. Der pH-Wert war auf 7,4 eingestellt. Für das Experiment wurde jeweils ein Ganglion in eine Plexiglas-Ableitkammer (Eigenbau, Feinmechanische Instituts-Werkstatt) transferiert, deren Boden mit optisch klarem Silicon- Kautschuk (Silgard, Dow Corning, Seneffe, B) ausgegossen war. Das Ganglion wurde dort mittels extrem kleiner Insekten-Nadeln (sog. Minutien) an mitpräparierten Resten des Neural-Rohres fixiert. Die Ableitkammer wurde nicht perfundiert und nicht thermostatisiert.

- Ganglion cervicale superior der Ratte

Ganglien wurden aus narkotisierten Ratten entnommen (2,5 g/kg Urethan, intra-peritoneal). Die Präparate befanden sich danach in einer Ratten-Krebslösung mit folgenden Bestandteilen (in mmol/l): NaCl 118; KCl 4,8; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄·2H₂O 1,2; MgCl₂·6H₂O 1,2; D-Glucose 11. Die Lösung wurde mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ begast, so daß sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Die Temperatur wurde thermostatisch auf 30°C geregelt. Während der Ableitung befand sich jeweils ein Ganglion in einer perfundierten (2 ml/min) Plexiglas-Ableitkammer (Eigenbau, Feinmechanische Instituts- Werkstatt). Das Ganglion wurde mit Saugelektroden (s. 2.2.) fixiert.

- Hirnschnittpräparate

Die Untersuchungen zur Langzeit-Potenzierung wurden ausschließlich an in-vitro-Schnittpräparaten des Hippocampus von Meerschweinchen durchgeführt. Neben seiner klaren Topographie und der damit verbundenen guten Zugänglichkeit der zu untersuchenden neuronalen Strukturen (s. 1.2.) zieht dieses Präparat seine Vorteile aus der guten in- vitro-Überlebensdauer des Präparates im hohen Stunden- Bereich (z. Überblick s. Dingledine, 1984). Diese Präparateigenschaften sind wesentlich für die Untersuchbarkeit von Langzeit-Effekten wie z.B. der neuronalen Plastizität.

Die Hirnschnittpräparate wurden nach der folgenden Methode gewonnen, die sich in vielen Labors als besonders günstig erwiesen hat (z. Überblick s. Dingledine et al., 1980; Lynch und Schubert, 1980;

Teyler, 1980). Meerschweinchen mit einem Gewicht von ca. 200 g wurden decapitiert, das Gehirn aus der Schädelkalotte gelöst, die beiden Hippocampi separiert, manuell transversal halbiert und auf einem Vibratom mit mechanischer Stabilisierung durch Agar-Agar-Blöcke montiert (Jefferys, 1981; Vibroslice Oscillating Tissue Slicer, Campden Instr., London). Die unter künstlicher Cerebrospinal-Flüssigkeit gewonnenen Transversalschnitte mit einer Dicke von 300 - 500 μm wurden sofort in ein Organbad transferiert und dort für ca. 30 - 60 min zur Erholung belassen.

In sämtlichen Fällen befanden sich die Hirnschnitt- Präparate in einer Meerschweinchen-Krebslösung mit folgenden Bestandteilen (in mmol/l): NaCl 118; KCl 3; CaCl_2 1,5; NaHCO_3 25; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,2; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1; D-Glucose 11. Die Lösung wurde mit einem Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 begast, so daß sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Die Temperatur wurde thermostatisch auf 30°C geregelt.

Während des eigentlichen Experimentes befanden sich jeweils zwei Hippocampus-Schnitte gleichzeitig in einer Ableitkammer, die ein Badvolumen von 2 ml hatte und kontinuierlich perfundiert wurde (ca. 2 ml/min). Die Präparate waren vollständig von Krebslösung umspült (Dingledine, 1984; submerged slices). Um ein Aufschwimmen der Präparate zu vermeiden, wurden sie zwischen zwei Nylonnetzen (Maschenweite ca. 1,5 mm) mechanisch fixiert. Diese Ableitkammer war zur Verbesserung der Beobachtung bei Durchlichtbeleuchtung mit einem Glasboden von 130 μm Dicke ausgestattet (Eigenbau, Feinmechanische Instituts- Werkstatt).

2.2. Konventionelle elektrophysiologische Stimulation und Ableitung

Die Stimulation der Präparate sowie die parallel zum optischen Verfahren durchgeführten Kontrollableitungen wurden mit konventionellen elektrophysiologischen Methoden vorgenommen.

- Invertebraten-Ganglien

Einzelne sensorische Neurone der Blutegel-Ganglien wurden mit depolarisierenden Strompulsen von ca. 1 nA für ca. 50 ms durch die Ableitelektrode stimuliert. Die hierzu verwendeten intrazellulären Glas-Mikroelektroden wurden aus Rohlingen (Außendurchmesser 1,5 mm, GC100F-15, Clark, Pangbourne, GB) mit einem Horizontal-Ziehgerät hergestellt (PN-3, Narishige, Tokyo, J). Nach rückseitiger Füllung mit 3 mol/l KCl-Lösung hatten sie Wechselstrom-Widerstände von ca. 60 MOhm bei 160 Hz. Die interessierenden Neurone wurden mit einer Kombination aus einem dreidimensionalen mechanischen Manipulator (R, Leitz, Wetzlar) und einem eindimensionalen hydraulischen Manipulator (MO-8, Narishige, Tokyo, J) unter visueller und elektrischer Kontrolle penetriert. Die elektrischen Potentiale wurden mit einem Brückenverstärker (8100, Dagan, Minneapolis, MN, USA) und einem Speicher-Oszilloskop kontrolliert (5027, Schlumberger, Marseille, F).

- Säugetier-Ganglien

Die Ratten-Ganglien wurden mit Saugelektroden präganglionär stimuliert und postganglionär zur Kontrolle abgeleitet. Diese Saug-elektroden bestanden aus Glaskapillaren (Außendurchmesser 2 mm) mit rundgeschmolzenen Spitzen (Durchmesser unter 1 mm) und waren in die Ableitkammer intergriert. Zusätzlich wurde aus einzelnen

oberflächlichen Neuronen intrazellulär abgeleitet (Mikroelektroden wie vorher).

- Hirnschnitt-Präparate

Die Hirnschnitt-Präparate wurden mit bipolaren Elektroden stimuliert. Diese Elektroden wurden aus lackisoliertem Wolfram-Draht (Durchmesser 100 μm) mit elektrolytisch erzeugten Spitzen hergestellt (Durchmesser kleiner 10 μm). Nach paarweiser Montage hatten sie einen Spitzenabstand von ca. 150 μm und zeigten einen Wechselstrom-Widerstand von 40 - 60 k Ω bei 160 Hz. Die Reizelektroden wurden mit jeweils einem dreidimensionalen mechanischen Mikro-manipulator (MM33, Märzhäuser, Wetzlar), bei welchem die Hauptvorschubrichtung motorisiert war, unter visueller Kontrolle positioniert (Präparier-Mikroskop). Die Reizelektroden wurden mit kurzen, stromkonstanten Pulsen (300 - 500 μA für ca. 100 μs) aus einem Reizgerät versorgt (Eigenbau der Instituts-Elektronikabt.).

LTPs wurden durch kurze "tetanische" Reize induziert. Es handelte sich dabei um 5 Salven, die im Abstand von 10 s appliziert wurden, jeweils mit einer Salvendauer von 2 s und einer Salvenfrequenz von 50 Hz. Die prä- und posttetanischen Kontroll-Stimulationen waren Einzelpulse im Abstand von 10 s.

Die extrazellulären Kontrollableitungen wurden ebenfalls mit Glas-Mikropipetten durchgeführt (hergestellt wie oben angegeben, GC100F-15, Clark, Pangbourne, GB), welche in diesem Fall jedoch perfusatgefüllt waren und unter visueller Kontrolle auf Spitzendurchmesser mit Widerstandswerten von 10 - 20 M Ω abgebrochen wurden. Die Ableitelektroden wurden wie oben unter visueller und elektrischer Kontrolle positioniert. Die elektrischen Feldpotentiale

wurden vorverstärkt und einem Oszilloskop zur Rohdaten-Kontrolle sowie einem Datenverarbeitungssystem zugeführt (s. 2.4.).

2.3. Optische Ableitung

Die erzielten Ergebnisse basieren auf Messungen von extrinsischer potential-sensitiver Fluoreszenz (s. 1.1.). Um die Membranen mit Fluoreszenz-Farbstoffen zu beladen, wurden die zu untersuchenden Präparate mit diesen Substanzen inkubiert. Dazu wurden Stammlösungen (1 mmol/l) der verwendeten Styryl-Farbstoffe (RH 237 bzw. RH 414, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) den Organbad-Lösungen zugesetzt. Die endgültigen Substanz-Konzentrationen betrugen 5 - 20 $\mu\text{mol/l}$. Die begrenzte Langzeitstabilität der Farbstoffe unter diesen Ableitbedingungen verlangte ein entsprechendes Vorgehen. Um photolytischen Effekten (z.B. Ausbleichung) vorzubeugen, wurden die Belichtungszeiten auf die effektiven Ableitzeiten begrenzt. Dies wurde durch schnelle, elektronisch gesteuerte Photoverschlüsse erreicht. Hydrolytischen Effekten (z.B. Auswaschung) konnte nur durch kontinuierliches "Nachfärben" begegnet werden. Im Falle der Invertebraten-Ganglien verblieb der Farbstoff während der gesamten Versuchsdurchführung in der Ableit-Kammer, da hier das Organbad nicht perfundiert wurde. In den anderen Fällen wurde für jeweils 20 min inkubiert und für diese Zeit die Perfusion (s. 2.1.) gestoppt.

Je nach Fragestellung und entsprechendem Präparat wurden die Untersuchungen an zwei unterschiedlichen Meßeinrichtungen durchgeführt. Grundsätzlich wurde jedoch ein modifiziertes, orts- und zeitaufgelöstes photometrisches Verfahren zur optischen Detektion neuronaler Aktivität benutzt. Bedingt durch die Dimension der zu untersuchenden Objekte (Mikrometer-Bereich) wurde ein Mikroskop- Photometer mit optimaler mechanischer Stabilität und geeigneter Fokussierbarkeit benötigt. Die Anforderungen an die mechanische **Stabilität** waren sehr hoch, da die zu

detektierenden relativen Änderungen der optischen Parameter (s. 1.1.) im Bereich von 10^{-5} - 10^{-3} lagen. Bei dieser geringen Sensitivität spielte bereits Mikrophonie eine nicht zu vernachlässigende Rolle, also die mechanische Erregung durch Schallwellen. Daher war es erforderlich, entsprechend massive Mikroskop-Tische zu verwenden, die außerdem relativ zur optischen Achse x-y-mikropositionierbar sein mußten. Dies wiederum bedingte eine **Fokussierbarkeit** des Mikroskopes über z-Bewegungen des Objektives. Normalerweise erfolgt die Fokussierung über z-Bewegungen des Mikroskop-Tisches.

- Ganglien-Präparate

Bei beiden Ganglien-Präparaten (s. 2.1.) wurde Fluoreszenz-Licht eines einzelnen oberflächlichen Neurons selektiert. Dieses Verfahren wird im folgenden als nicht- ortsauflösend bezeichnet, da hier nur zeitliche Änderungen des detektierten Lichtes beobachtet werden können. Nachfolgend sollen die verschiedenen Komponenten der verwendeten optischen Ableiteinrichtung erläutert werden (s. **Abb. 4**).

Monochromatisches Licht mit einer Anregungswellenlänge λ_{ex} und einer relativen Amplituden-Stabilität von 10^{-4} wurde mit einer Beleuchtungs-Einrichtung erzeugt. Diese Einrichtung bestand aus einem Hg-Brenner (**MB**, HBO 100, Osram, München), einem Anregungsfilter (**PF**, 540 ± 20 nm, Corion, Hollistone, MA, USA bzw. Schott, Mainz) und einem Photoverschluß (**SH**, Uniblitz, Vincent, Rochester, NY, USA). Das Exzitations-Licht wurde an einem dichroitischen Strahlteiler-Spiegel (**DM**, FT 580, Zeiss, Oberkochen) selektiv reflektiert und über ein salzwasserimmersionstaugliches Objektiv (**OB**, SW/V1 40/0,75, Zeiss, Oberkochen) auf das Präparat fokussiert. Das Präparat befand sich in der Objektebene (**OP**) eines Mikroskopes. Fluoreszenz-Licht der Emissionswellenlänge λ_{em} passierte den wellenlängenselektiven Spiegel (**DM**). Durch eine

einstellbare Blende (**DP**, Rechteckblende, Leitz, Wetzlar), welche sich in der Zwischenbildebene (**IP**) befand, konnte die jeweils interessierende Objektstruktur ausgewählt werden. Ein nachfolgendes Sperrfilter (**CF**, OG 590 bzw. RG 510, Schott, Mainz) verhinderte das Auftreffen von Anregungs-Streulicht auf dem Detektor (PhotoMultiplier, **PMT**, R 943, Hamamatsu, Herrsching). Eine Vorverarbeitungselektronik (**CFA**, Eigenbau) separierte die interessierende dynamische Fluoreszenz (**ΔF**) von der statischen Komponente (**F**).

Das verwendete Photometer-System bestand aus einem Epifluoreszenz-Mikroskop (UEM, Zeiss, Oberkochen), welches auf einem vibrationsisolierten Tisch (Zero-G, Anaspec, Darmstadt) fixiert war. Das Mikroskop war mit einem speziellen Mikroskop-Tisch (Eigenbau, Feinmechanische Instituts-Werkstatt) ausgestattet, um die Unterbringung der Manipulatoren zur konventionellen elektrophysiologischen Stimulation und Ableitung (s. 2.2.) zu ermöglichen. Dieser Tisch erlaubte die x-y-Justierung der interessierenden Präparat-Struktur relativ zur optischen Achse des Mikroskopes bei gleichzeitig extra- bzw. intrazellulär positionierten Reiz- und Ableit-Elektroden.

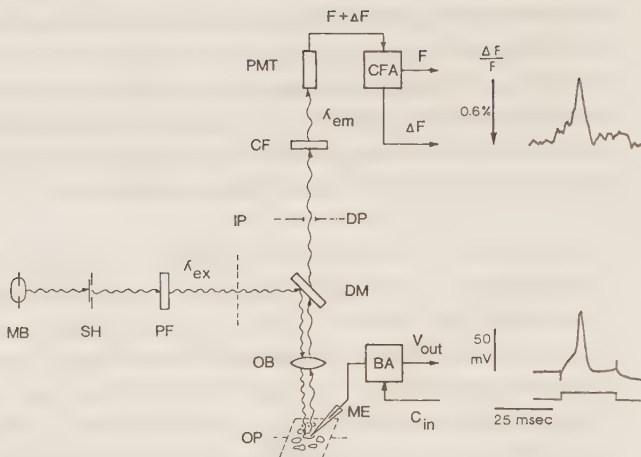


Abb. 4: Epifluoreszenz-Einrichtung zur optischen Detektion neuronaler Aktivität mit zusätzlicher konventioneller Mikroelektroden-Kontrollableitung.

Erläuterungen s. Text

Abkürzungen:

BA:	Brücken-Verstärker (Bridge Amplifier)
CF:	Sperrfilter (Cutoff Filter)
CFA:	Vorverarbeitungselektronik (Converter/Filter/Amplifier)
DM:	Strahlteiler-Spiegel (Dichroic Mirror)
DP:	Blende (Diaphragma)
F:	statische Fluoreszenz
ΔF:	dynamische Fluoreszenz
IP:	Zwischenbildebene (Image Plane)
MB:	Hg-Brenner (Mercury Burner)
ME:	Mikroelektrode
OB:	Objektiv
OP:	Objektebene (Object Plane)
PF:	Anregungsfilter (Peak Filter)
PMT:	Photo-Multiplier (Photo Multiplier Tube)
SH:	Photoverschluß (Shutter)

- Hirnschnitt-Präparate

Bei den Hirnschnitt-Präparaten wurde neben dem oben erwähnten nicht-ortsauflösenden Verfahren das ortsauflösende Verfahren mittels Bildabtastung (s. 1.1.) bevorzugt verwendet. Dadurch war es möglich, innerhalb einer begrenzten Fläche an bis zu 100 Orten simultan die lokale Fluoreszenz zu registrieren und damit die neuronale Aktivität der interessierenden Population ortsaufgelöst zu beobachten (s. Abb. 5).

Bei dem hier verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein inverses Epifluoreszenz-System (IM, Zeiss, Oberkochen), welches, wie vorher beschrieben, vibrationsisoliert sowie optisch und mechanisch ausgestattet war. Die Beleuchtungs-Einrichtung war gegenüber den Ganglien-Präparaten unverändert. Die Beobachtungs-Einrichtung war dahingehend modifiziert, daß sich zusätzlich zur Objektblende in einer weiteren Zwischenbildebene des Mikroskopes als Detektor eine Photodioden-Matrix befand (**PDM**, MD 100, Centronic, Croydon, UK) und entsprechende Verstärker (**CFA**, **MUX**, **SEL**, Eigenbau) eingesetzt wurden.

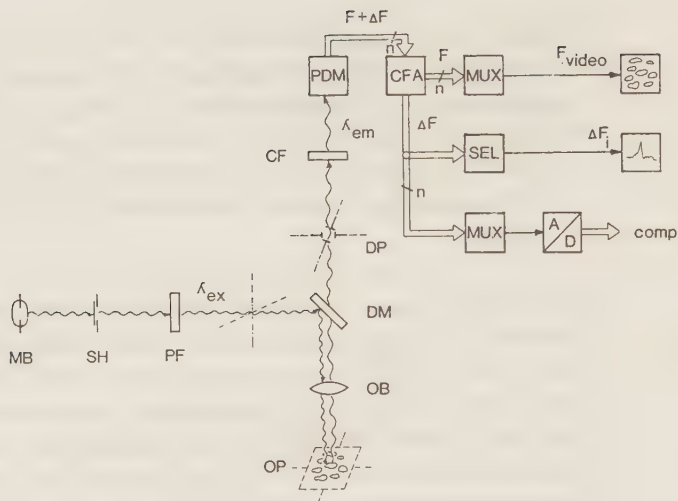


Abb. 5: Epifluoreszenz-Einrichtung zur orts aufgelösten optischen Erfassung neuronaler Aktivität

Anordnung mit Photodioden-Matrix (PDM) als ortsauflösendem Detektor in einer Bildebene des Mikroskopes.

Abkürzungen:	A/D:	Analog/Digital-Wandler
	CF:	Sperrfilter (Cutoff Filter)
	CFA:	Vorverarbeitungselektronik (Converter/Filter/Amplifier)
	DM:	Strahlteiler-Spiegel (Dichroic Mirror)
	DP:	Blende (Diaphragma)
	F:	statische Fluoreszenz
	ΔF:	dynamische Fluoreszenz
	MB:	Hg-Brenner (Mercury Burner)
	MUX:	Multiplexer
	OB:	Objektiv
	OP:	Objektebene (Object Plane)
	PF:	Anregungsfilter (Peak Filter)
	SEL:	Kanal-Wähler (Channel Selector)
	SH:	Photoverschluß (Shutter)

2.4. Aufnahme, Verarbeitung und Darstellung der Versuchsdaten

Für alle Präparate und Ableitarten wurde ein einheitliches optisches Ableitprotokoll verwendet. Ein zentraler Zeitgeber (Eigenbau der Instituts-Elektronikabt.) steuerte dabei die verschiedenen Komponenten des Meß-Systems.

Jedes Experiment begann nach dem Anfärbe-Vorgang mit der Messung der mittleren initialen statischen Fluoreszenz (F_{init}). Dieser Wert gab Auskunft über die Menge des membrangebundenen Farbstoffes und ermöglichte vergleichbare Versuchsbedingungen. Um farbstoffbedingte Langzeit-Änderungen der optischen Parameter zu eliminieren, mußte ein Algorithmus zur Korrektur dieser Effekte (s. 2.3., Ausbleichung, Auswaschung) entwickelt werden. Dementsprechend wurde zu Beginn jedes Meßvorganges die aktuelle statische Fluoreszenz für jedes Detektor-Element getrennt gemessen ($F_{\text{akt},i}$). Die entsprechenden lokalen Photoströme dienten im weiteren Verlauf als Bezugswert, auf den die laufenden Messungen der dynamischen Fluoreszenz ($\Delta F_{\text{akt},i}$) normiert wurden. Diese Korrekturmaßnahmen erlaubten sogar ein intermediäres "Nachfärben" während des Versuchsablaufes.

Der einzelne Meßvorgang folgte immer einem definierten Protokoll:

- Öffnen des Photoverschlusses
- Starten der Messung
- Stimulieren des Präparates
- Schließen des Photoverschlusses
- Mittelwert- und Korrektur-Rechnung
- Darstellung auf Bildschirm

Die optischen Signale wurden zunächst analog vorverarbeitet, dann digital weiterverarbeitet und gespeichert. Um einen interaktiven Experiment-

ablauf zu ermöglichen, wurden sie kontinuierlich auf einem Bildschirm dargestellt.

- Analoge Vorverarbeitung

Die fluoreszenzkorrelierten Photoströme $I + \Delta I \sim F + \Delta F$ wurden in proportionale Spannungen $U + \Delta U$ gewandelt (I/U-Wandler). Dabei wurde auf optimalen apparativen Störabstand geachtet. Unter dem Störabstand (S/N) wird das Verhältnis von interessierendem potentialkorrelierten Nutzsignal (Signal) zu allgemeinem Störsignal (Noise) verstanden. Dies wurde durch möglichst hohe Transimpedanz (100 M Ω) der I/U- Wandler erreicht, da das Fluoreszenz-Nutzsignal proportional zum Rückführ-Widerstand (Ohmsches Gesetz: $U_{\text{signal}} \sim R$), das Rausch-Störsignal dagegen proportional zur Wurzel dieses Widerstandes ist ($U_{\text{noise}} \sim \sqrt{R}$). Zudem wurde die Frequenz-Bandbreite der optisch gewonnenen Signale bereits hier auf den physiologisch relevanten Bereich (bis 1 kHz) begrenzt. Der Wechselspannungs-Anteil (AC) $\Delta U \sim \Delta F$, welcher mit der neuronalen Aktivität korreliert ist, wurde vom Gleichspannungs-Anteil (DC) $U \sim F$, der die Menge des membrangebundenen Fluoreszenz-Farbstoffes darstellt, durch eine steuerbare AC/DC-Koppelung abgetrennt. Dann wurden AC- und DC-Anteil getrennt in den Bereich ± 10 V verstärkt.

Im Falle des nicht-ortsaufgelösten Verfahrens wurde entsprechend dem Einzel-Detektor nur ein Vorverarbeitungs-Kanal benötigt. Dagegen erfolgte im Falle der ortsaufgelösten optischen Ableitung (s. 1.1.) diese analoge Vorverarbeitung getrennt für jeden der 100 Detektoren der Photodioden-Matrix. Hier wandelte ein nachfolgender Multiplexer (MUX, 1 aus n Analogschalter) die parallelen Ausgangssignale in ein serielles, zur Weiterverarbeitung geeignetes Signal.

- Digitale Verarbeitung und Darstellung

Die weiter unten dargestellten Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Laborrechner-Systems (LSI-11/23, DEC, Maynard, MA, USA) verarbeitet, welches entsprechend den beschriebenen Anforderungen mit digitalen und analogen Modulen erweitert wurde. Die AnalogDaten wurden mit einem schnellen A/D- Wandler (12 bit, DT 2751, Data Translation, Marlboro, MA, USA) erfaßt, der eine maximale Konversionsrate von 200 kHz erlaubte. Damit ergab sich pro Kanal eine Abtastrate von 2 kHz und somit eine Grenzfrequenz von 1 kHz. Die oben beschriebene vorverarbeitende Elektronik wurde vom Laborrechner-System mittels einer digitalen Ein- und Ausgabeeinheit (16 bit, DT 2768, Data Translation) kontrolliert. Die interne Verarbeitung der experimentellen Daten (Mittelwert- und Korrektur-Rechnung) wurde durch einen zusätzlichen Feldrechner (Skymnk-Q, Sky Computers, Lowell, MA, USA) geschwindigkeitsmäßig an die Echtzeit-Anforderungen angepaßt. Die Darstellung der verarbeiteten Daten erfolgte schließlich während der Versuchsdurchführung mittels einer Video-Ausgabeeinheit (AP 512, FB 512, Imaging Technology, Woburn, MA, USA) auf einem RGB-Farbmonitor (CM 33 C, Barco, Kortrijk, B) und zur Dokumentation auf einem digitalen x/y-Farbschreiber (281, Metrawatt, BBC). Das Laborrechner-System war in FORTRAN programmiert, wobei Bibliotheks-Routinen der Hersteller der analogen und digitalen Module einbezogen wurden (CP- Lib, DT-Lib, Data Translation; Sky-Lib, Sky Computers; XGS, Tewidata, München).

3. Ergebnisse

3.1. Registrierung an Ganglienpräparaten

Die optische Registrierung neuronaler Signale wurde zunächst an geeigneten Ganglien-Präparaten von Invertebraten und Säugetieren in-vitro eingeführt und auf ihre prinzipielle Brauchbarkeit überprüft (s. 2.1., 2.2.). Es handelte sich dabei anfangs um das Segmentalganglion des Blutegels und nachfolgend um das Ganglion cervicale superior der Ratte.

- Segmentalganglion des Blutegels

An Segmentalganglien des Blutegels wurde aus sensorischen Neuronen intrazellulär mit Mikroelektroden und parallel dazu mit optischen Methoden abgeleitet. **Abb. 6.** zeigt unter **A** schematisch das Präparat und die untersuchten Zellen. Bei diesen sensorischen Neuronen mit einer Größe von ca. 60 μm handelte es sich um nociceptive (N), druck- sensible (P) und berührungssensible (T) Zellen. Unter **B** ist mikrophotographisch das Transmissions- und das Fluoreszenzverhalten einer mit potentialsensitiver Substanz gefärbten N-Zelle dargestellt. Die Transmission wurde bei 650 nm gemessen, also außerhalb des Absorptions-Bereiches der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffes (520 - 560 nm). In der Badlösung befanden sich 5 $\mu\text{mol/l}$ eines potentialsensitiven Styryl-Farbstoffes (Styryl dye). Dieser Farbstoff kann im Bad verbleiben, da nur membrangebundene Moleküle nennenswert fluoreszieren. Das helle Rechteck stellt jeweils die Apertur der Objektblende dar, welche die interessierende Objektstruktur selektiert (s. 1.1.). Unter **C** sind optische und elektrische Ableitung eines nach 16 Schritten gemittelten Aktionspotentials (AP) gegenübergestellt, welches durch depolarisierende Strominjektion ausgelöst wurde. Die Ableitungen zeigen die Proportionalität

von intrazellulären und optischen Signalen bei einem Störabstand größer 2 bei Einzelantworten (s. 2.4.).

- Ganglion cervicale superior der Ratte

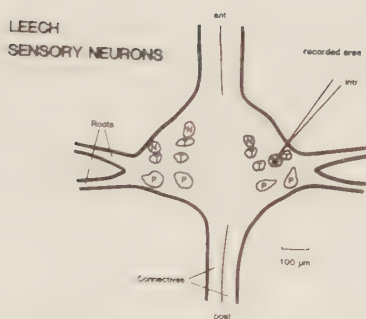
Am Halsganglion der Ratte wurde mit einzelnen sympathischen Neuronen entsprechend verfahren. Hier wurden jedoch die präganglionären Fasern mittels einer Saugelektrode stimuliert. **Abb. 7** zeigt unter **A** ebenfalls schematisch das Präparat sowie das experimentelle Vorgehen. Die untersuchten Neurone sind ca. 30 μm groß. Unter **B** ist wieder mikrophotographisch ein entsprechend gefärbtes sympathisches Neuron sowie der optisch erfaßte Ausschnitt des Präparates zu erkennen. Unter **C** werden wiederum optische und elektrische Ableitungen miteinander verglichen. Der Störabstand ist hier größer 8, jedoch ist die optische Ableitung nicht vollständig auf ein einzelnes Neuron beschränkt, wie aus der Dauer, der Schulter und der Nachhyperpolarisation des optisch erfaßten Potentials vermutet werden kann (s. 4.4.).

Diese an den Testpräparaten gewonnenen Ergebnisse zeigten die grundsätzliche Eignung der Methode zur Beobachtung elektrophysiologischer Phänomene.

Abb. 6: Segmental-Ganglion des Blutegeles

- A:** Schematische Darstellung des Segmental-Ganglion des Blutegeles. Der optisch erfaßte Bereich eines intrazellulär abgeleiteten (intr) nociceptiven Neurons (**N-Cell**) ist schattiert dargestellt (recorded area).
- B:** Mikrophotographische Darstellung des Transmissions- (**T**) und Fluoreszenzverhaltens (**F**) des betreffenden ca. 60 µm großen sensorischen Neurons. Der helle, rechteckige Bereich ist das Bild der Objektblende und entspricht somit dem optisch erfaßten Areal.
- C:** Gleichzeitige optische ($\Delta F/F$, obere Spur) und intrazelluläre elektrische Ableitung (mittlere Spur) während depolarisierender Strominjektion (untere Spur).
16 Antworten wurden gemittelt.

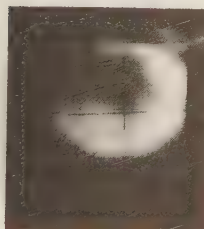
A



B

N-CELL

Styryl dye



T (650 nm)

F (550/610 nm)

10 μm

C

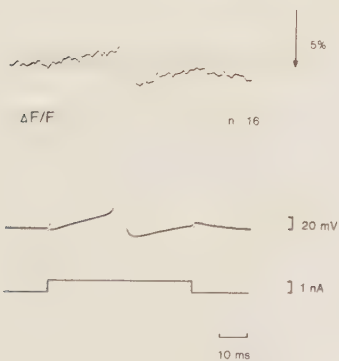
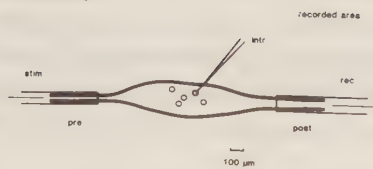
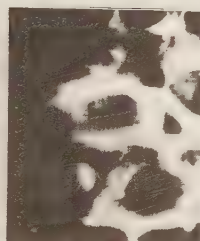
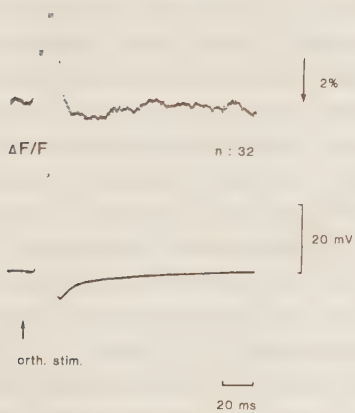


Abb. 7: Ganglion cervicale superior (SCG) der Ratte

- A: Schematische Darstellung der Reiz- und Ableitsituation. Das isolierte Ganglion wurde mit Saugelektroden präsynaptisch (pre) elektrisch gereizt (stim) und APs wurden intrazellulär (intr) abgeleitet. Das simultan optisch erfaßte Areal ist schattiert (recorded area).
- B: Mikrophotographische Darstellung des Transmissions- (T) und Fluoreszenzverhaltens (F). In dem hellen, optisch erfaßten Areal ist ein ca. 30 μm großes sympathisches Neuron zu erkennen.
- C: Optische ($\Delta F/F$, obere Spur) und elektrische (untere Spur) Ableitungen bei orthodromer Stimulation der Afferenzen. 32 Antworten wurden gemittelt.

A**RAT
SCG NEURONS****B****SCG-CELLS****Styryl dye****T (650 nm)****F (550/610 nm)**
10 μm**C**

3.2. Registrierungen am hippocampalen Schnittpräparat

In einem weiteren Schritt konnte die Eignung der spannungs-abhängigen Fluoreszenz für Messungen der neuronalen Aktivität an zentral-nervösen Schnittpräparaten erstmals gezeigt werden (Saggau et al., 1986a). Dies erfolgte am hippocampalen Hirnschnitt des Meerschweinchens.

- Optisch detektierte neuronale Aktivität

Die neuronale Aktivität wurde zunächst ebenfalls ohne Ortsauflösung gemessen. **Abb. 8** veranschaulicht unter **A** das experimentelle Vorgehen. In transversalen Hippocampus- Schnitten wurde die Population der CA1-Neurone orthodrom über die Schaffer-Kollateralen des Stratum radiatum stimuliert. Die so evozierte neuronale Aktivität wurde optisch ($250 \times 250 \mu\text{m}$ großes Areal) und parallel elektro-physiologisch abgeleitet. Letzteres erfolgte mit Hilfe einer extra-zellulären Glas-Mikroelektrode im Stratum pyramidale. Unter **B** sind die resultierenden Ableitungen dargestellt. Die unterste Spur zeigt die konventionelle Feldpotential- Registrierung aus dem Stratum pyramidale. Ca. 5 ms nach Stimulation ist eine schwache, transiente Negativierung angedeutet, welche die Aktivität der afferenten Schaffer-Kollateralen repräsentiert. Die darauf folgende Positivierung, hervorgerufen durch postsynaptische Potentiale im Stratum radiatum, wird durch eine deutliche transiente Negativierung von etwa 3 mV Amplitude und einigen Millisekunden Dauer unterbrochen. Dieses Signal entspricht dem überlagerten Summenaktionspotential der in der CA1-Region gelegenen Pyramidenzellen, dem sog. Populations-Spike. Die über der elektrischen Ableitung angeordneten Spuren zeigen optische Registrierungen bei verschiedener Anzahl von Mittelungsschritten. Die erkennbare Verbesserung des Störabstandes mit zunehmender Anzahl der Schritte ist offensichtlich, demzufolge wurde im weiteren Verlauf routinemäßig gemittelt. In der obersten

Ableitung ($n = 16$) fällt neben dem Populations-Spike eine zeitlich voreilende Schulter auf, welche prä- und postsynaptische Aktivität repräsentiert. Beachtung fordert die Polarität der optischen Ableitungen: lokale Depolarisationen äußern sich immer in einer Abnahme der lokalen Fluoreszenz, unabhängig vom Ort des Potentials.

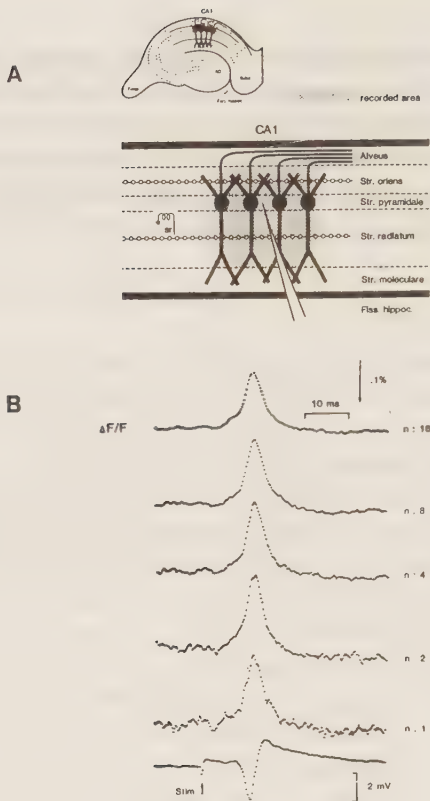


Abb. 8: Vergleich von optischen und elektrischen Signalen am hippocampalen Hirnschnitt

- A:** Darstellung der Topographie des Hippocampus mit schematischem Detail der in der CA1-Region gelegenen Pyramidenzellen. Das optisch erfaßte Areal ist grau hinterlegt (recorded area).
- B:** Vergleich von optischer und elektrischer Ableitung bei verschiedener Anzahl von Mittelungsschritten des optischen Signales. Der Stimulationszeitpunkt ist durch einen Pfeil markiert.

- Verifizierung der optischen Signale

Zur Verifizierung des neuronalen Ursprungs der optisch detektierten Signale wurde die Aktivität der untersuchten Neuronenpopulation pharmakologisch manipuliert, während gleichzeitig elektrophysiologische Kontrollableitungen durchgeführt wurden.

In **Abb. 9** ist das Protokoll einer derartigen Untersuchung dargestellt. In der oberen Reihe sind optische und elektrische Originalableitungen nach orthodromer Stimulation der Pyramidenzellen der CA1-Region zu erkennen. Die jeweilige ionale bzw. pharmakologische Situation ist gekennzeichnet. Bei **1** sind die Signale unter Kontrollbedingungen (**control**) dargestellt. Nach orthodromer Stimulation (Pfeil) ist der übliche Verlauf der Feldpotentialregistrierung zu beobachten: afferentes Summenpotential, Feld-EPSP, primärer Populations-Spike und mit kleinerer Amplitude sekundärer Pop-Spike. Das optische Signal zeigt den äquivalenten Verlauf. Unter **2** ist die Situation bei blockierter synaptischer Übertragung dargestellt. Hierzu wurde das Präparat mit Ca^{2+} -freier (**zero calcium**) Lösung superfundiert. Die Bilanz der divalenten Kationen war durch äquimolare Substitution mit Mg^{2+} ausgeglichen. Sowohl in der elektrischen als auch in der optischen Ableitung ist eine verbleibende Rest-Aktivität zu erkennen, die der unveränderten Erregung der afferenten Fasern zugeschrieben werden muß. Um die Möglichkeit eines Artefaktes auszuschließen, hervorgerufen durch den elektrischen Stimulationsstrom, wurde nach Rückkehr zu physiologischer Badlösung (**3, wash**) Tetrodotoxin (TTX, $2 \mu\text{mol/l}$) badappliziert. TTX ist ein reversibler Na^+ -Kanal-Blocker (Narahashi et. al., 1964), der die neuronale Aktivität blockiert. In dieser Situation sind alle evozierten optischen und elektrischen Signale vollständig verschwunden (**4, TTX**). Unter **5** ist die teilweise Restitution der neuronalen Aktivität nach einer Auswaschphase (**wash**) von ca. 2 h zu erkennen. In der unteren Kurve sind die Amplituden des

Populations-Spike, auf die jeweiligen Anfangswerte normalisiert, fortlaufend dargestellt. Die Zeitpunkte, zu denen die abgebildeten Originalableitungen gewonnen wurden, sind gekennzeichnet. Das äquivalente Verhalten von optischer und elektrischer Ableitung ist gut zu erkennen.

Dieses über 3 Stunden dauernde Versuchs-Protokoll zeigt die Eignung des optischen Verfahrens für die Beobachtung von Langzeit-Effekten. Das Präparat wurde während des gesamten Experimentes nicht nachgefärbt. Der Vergleich der Originalableitungen 1 und 5 läßt eine tolerierbare Reduzierung des Störabstandes erkennen.

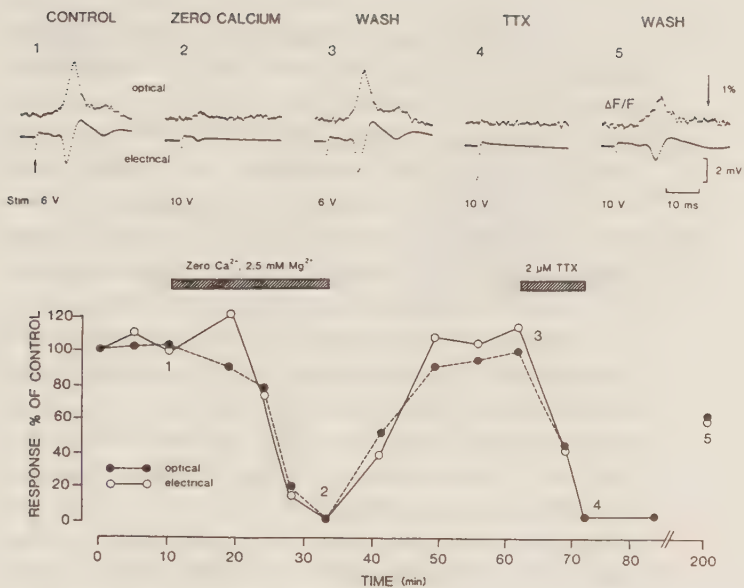


Abb. 9: Effekte von Ca^{2+} -freier und TTX-haltiger Lösung auf orthodrom evozierte Potentiale in der CA1-Region.

Der Zeitpunkt der Originalableitungen (obere Reihe optische, untere Reihe elektrische Signale, Mittelwert aus 16 Messungen) ist in dem unteren Protokoll in Form der entsprechenden Zahlen angegeben. In der unteren Graphik sind die relativen Amplituden in Abhängigkeit der Versuchszeit dargestellt. Die Phasen pharmakologischer Manipulationen sind durch gestreifte Balken gekennzeichnet (Erläuterungen s. Text).

- Räumliche Erregungsausbreitung

In einem weiteren Schritt wurde die Erregungsausbreitung nach Stimulation afferenter Wege untersucht. Dazu wurden die Schaffer-Kollateralen gereizt, ein ca. $500 \times 500 \mu\text{m}$ großes Areal optisch erfaßt und gleichzeitig dazu Feldpotentiale in der Somaregion konventionell abgeleitet (**s. Abb. 10.C**). Dieses optisch abgeleitete Areal wurde senkrecht zur Achse der Pyramidenzellen in 5 Streifen zu je $500 \times 100 \mu\text{m}$ unterteilt (schematische Darstellung in **B**). **A** veranschaulicht die beobachtete Erregungsausbreitung nach orthodromer Stimulation. Die oberen 5 Kurven (**Aa...Ae**) sind die optischen Signale, die untere Kurve stellt das elektrische Signal dar. Die afferente Erregung zeigte sich in der optischen Ableitung ca. 5 ms nach elektrischer Reizung somafern im Bereich der apikalen Dendriten (**Aa**). Die bei einem Abstand der Reizelektrode von ca. 1 mm errechnete Leitungsgeschwindigkeit der Schaffer- Kollateralen liegt bei ca. 0,2 m/s und deckt sich mit konventionellen elektrischen Messungen (Andersen et al. 1980b). Die zeitliche Breite der Faserantwort dürfte zum einen auf die Afferenz-Dispersion durch den entfernten Reizort und zum anderen auf die Länge des Ableitfensters von $500 \mu\text{m}$ zurückzuführen sein. Im Stratum pyramidale, dem Bereich der Somata der CA1-Prinzipalzellen, ist eine prominente optische Antwort mit einer Latenz von ca. 7 ms gegenüber dem afferenten Potential zu erkennen (**Ac**). Sie fällt zeitlich mit dem Populations-Spike der elektrischen Ableitung zusammen und entspricht vermutlich der Soma- Aktivität der CA1-Pyramidenzellen. Ebenfalls erkennbar ist ein früheres und kleineres optisches Potential, welches vermutlich den EPSP-Verlauf darstellt. In der optischen Ableitung des Stratum oriens (**Ad**) und des Alveus (**Ae**), dem Übergangsbereich zu den Axonen und dem Bereich der Axone selbst, finden sich Potentiale mit großer Anstiegssteilheit, die efferent fortgeleiteten Aktionspotentialen entsprechen dürften.

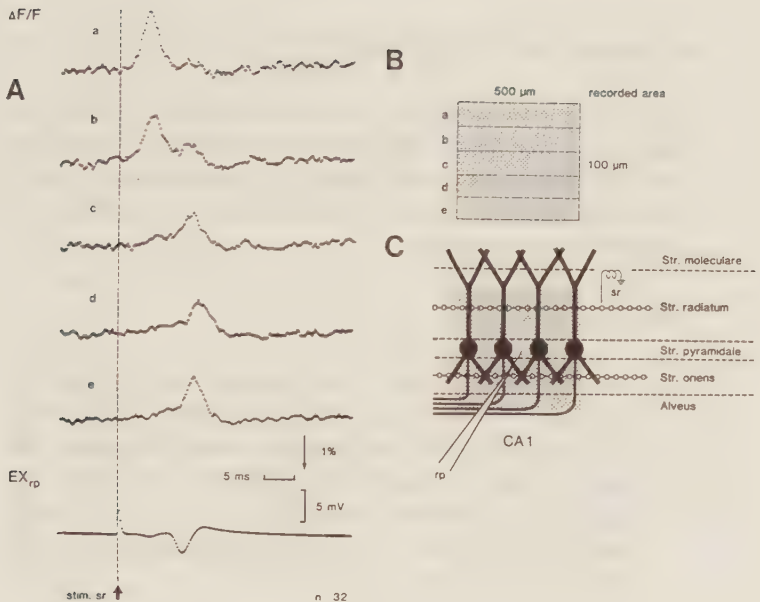


Abb. 10: Erregungsausbreitung nach orthodromer Stimulation

- A:** Ortsaufgelöste Darstellung der optisch erfaßten Signale. Der Reizzeitpunkt ist markiert, die Reizelektrode befand sich ca. 1 mm von der Ableitstelle entfernt im Bereich der CA2-Neurone. Die unterste Spur zeigt die Kontrollregistrierung der Feldpotentiale. 32 Messungen wurden gemittelt.
- Aa:** Stratum radiatum, somafern. **Ab:** Stratum radiatum, somanahe. **Ac:** Stratum pyramidale. **Ad:** Stratum oriens. **Ae:** Übergangsbereich zwischen Stratum oriens und Alveus.
- B:** Darstellung der Ortsauflösung des erfaßten Areals, a...e sind 5 benachbarte Streifen von je 500 x 100 μm.
- C:** Stimulations- und Ableitsituation. Die Reizelektrode wurde im Stratum radiatum plaziert, die extrazelluläre Ableitelektrode im Stratum pyramidale. Der schattierte Bereich stellt das optisch erfaßte Areal von 500 x 500 μm dar (recorded area).

3.3. Optische Detektion von Langzeit-Effekten

Auf Grund der unter 3.2. beschriebenen Langzeit- Stabilität der optischen Methode konnte das Übertragungsverhalten vor und nach tetanischen Reizen beobachtet werden. So konnten langanhaltende synaptische Modulationen in Form von klassischen und von homosynaptischen LTPs untersucht werden.

- Klassische LTPs

Langanhaltende plastische Veränderungen der synaptischen Übertragung wurden durch tetanische Reizung der Schaffer-Kollateralen induziert (s. 2.2.). Diese Langzeit- Potenzierung entwickelte sich nach vorübergehender posttetanischer Depression innerhalb von ca. 10 bis 30 min (Alger et al., 1978; Lynch et al., 1977). Die erzielten LTP-Effekte waren in-vitro für Stunden bis zum Versuchsende zu beobachten.

In **Abb. 11** ist das Ergebnis eines repräsentativen LTP- Experimentes dargestellt. Dazu wurden prä- und posttetanisch die Amplituden von Populations-Spikes der untersuchten CA1-Population bei verschiedenen Reizstärken optisch und elektrisch bestimmt. Die Reiz-/Antwortkurve stellt die relativen Antworten (**response % of maximum**) in Abhängigkeit zur Reizstärke (**stim**) dar. Erkennbar ist hier der Potenzierungs-Effekt als eine Linksverschiebung der typischen sigmoiden Kurve hin zu niedrigeren Reizstärken. Die eingeblendeten Originalableitungen bei der Reizstärke 3 V zeigen die gute Übereinstimmung von optischen und elektrischen Meßwerten. Zudem ist bei dieser Reizstärke die Potenzierung im Vergleich von Kontroll-Antwort (**control**) mit der posttetanischen Antwort (**post tet**) besonders deutlich zu erkennen.

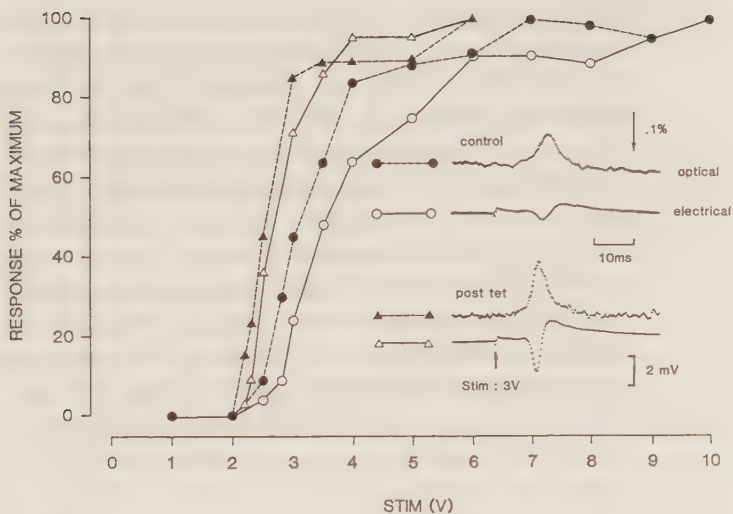


Abb. 11: Klassische LTP der CA1-Population

Die Originalableitungen verdeutlichen die prä- (Kreise) und posttetanischen (Dreiecke) Antworten und vergleichen die optisch (gestrichelt) mit den elektrisch (durchgehend) ermittelten Meßwerten. Der Stimulationszeitpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Es wurden jeweils 16 Messungen gemittelt.

- Homosynaptische LTPs

Durch Tetanisierung funktionell unabhängiger afferenter Bahnen konnten homosynaptische Langzeit-Effekte (s. 1.3.) induziert werden.

Abb. 12C veranschaulicht die Reizsituation in der untersuchten CA1-Population. Reizelektroden wurden im Stratum radiatum und im Stratum oriens plaziert, gleichzeitig wurden aus der Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale) elektrische Feldpotentiale abgeleitet. Das optisch erfaßte Areal ist grau hinterlegt. In **Abb. 12B** ist das Schema der Reduzierung der räumlichen Auflösung zu erkennen. Dazu wurden in einer Photodioden-Matrix mit 10 x 10 Elementen, jeweils 20 Detektor-Elemente zusammengefaßt, so daß sich 5 Streifen (a...e) von je 400 x 80 µm ergaben und damit ein Quadrat von 400 x 400 µm. In **Abb. 12A** schließlich sind die Ergebnisse dieses Experimentes anhand von Originalableitungen dargestellt. Die oberen 5 Kurven (a...e) sind jeweils die optischen Signale, während die untere Kurve das elektrische Signal darstellt. Die Stimulationszeitpunkte sind durch senkrechte Pfeile markiert, wobei der kurze Pfeil einem Kontrollreiz in Stratum radiatum, der lange Pfeil einem solchen im Stratum oriens entspricht.

Der erste Kurvenblock (**afferent volleys**) stellt die Erregungssituation bei blockierter synaptischer Übertragung dar. Die Blockierung wurde hier nicht durch Ca^{2+} -Entzug der Badlösung (s. 3.2.) erzeugt, sondern es wurde die transiente hypoxische Situation der synaptischen Transmission am Ende der Anfärbephase (s. 2.3.) ausgenutzt. Nach Stimulation im **Stratum radiatum** (s. kleiner Pfeil bzw. erster Reizartefakt in der elektrischen Ableitung) ist in den optischen Ableitungen **a** und **b**, also nur im Bereich der aktivierten afferenten Fasern, eine lokale Depolarisation zu erkennen. In den optischen Ableitungen **c...e**, also im Bereich der Pyramidenzellschicht sowie im Bereich der nicht

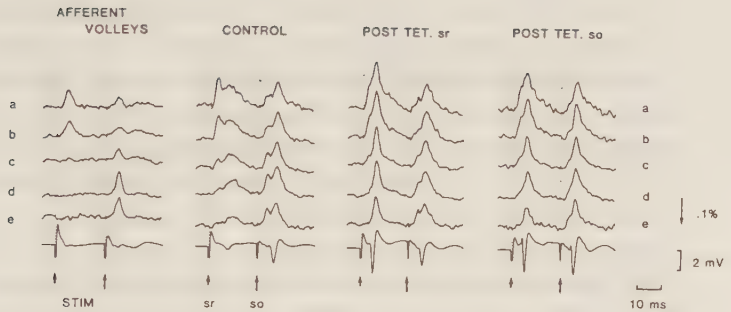
aktivierten afferenten Fasern des Stratum oriens und der efferenten Fasern des Alveus, sind bei Reizung im Stratum radiatum keine Depolarisationen zu erkennen. Nach Stimulation im **Stratum oriens** (s. großer Pfeil bzw. zweiter Reizartefakt in der elektrischen Ableitung) kommt es ebenfalls zu einer deutlichen Depolarisation im Bereich der aktivierten afferenten Fasern (optische Ableitungen **d** und **e**). Die hier auch in Ableitung **a...c** detektierten Fluoreszenz-Änderungen sind vermutlich auf ein Übersprechen des Reizstromes über das Stratum pyramidale hinweg auf das Stratum radiatum zurückzuführen.

Der zweite Kurvenblock (**control**) stellt die eigentliche prätetanische Kontrollsituation nach Wiederaufnahme der Badperfusion und Erreichen stabiler Verhältnisse dar. Neben den etwas vergrößerten afferenten Faserpotentialen ist jetzt auch die postsynaptische Depolarisation sowohl in der elektrischen als auch in der optischen Registrierung zu erkennen.

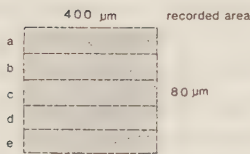
Der dritte Kurvenblock (**post tet. sr**) zeigt das Antwortverhalten nach alleiniger Tetanisierung des **Stratum radiatum**. Hier ist eine deutliche Zunahme der postsynaptischen Antwort unter Kontrollreizung nur bei Stimulation der tetanisierten Afferenzen zu erkennen. Dies gilt sowohl für die optischen als auch für die elektrischen Ableitungen. Die unveränderte präsynaptische Depolarisation, wie sie an den "Schultern" in der optischen Ableitungen **a...c** zu erkennen ist, verdeutlicht die gleiche effektive Reizstärke wie in der prätetanischen Kontrollsituation. Die postsynaptischen Kontrollantwort des nicht tetanisierten Stratum oriens dagegen zeigt keine Veränderung. Dieser homosynaptischen Potenzierung, die sich ca. 20 min nach der Tetanisierung einstellte, ging eine Phase der heterosynaptischen Depression voran, in der beide Kontrollantworten stark reduziert waren (Lynch et al., 1977).

Der letzte Kurvenblock schließlich (**post tet. so**) zeigt das entsprechende Antwort-Verhalten auf die nachfolgend vorgenommene alleinige Tetanisierung des **Stratum oriens**. Hier ist eine Zunahme der postsynaptischen Antwort auf eine Testreiz hin ebenfalls nur bei der Stimulation tetanisierter Fasern zu erkennen. Die Umkehrung des Tetanisierungs-Protokolls bestätigte die Homosynaptizität.

A



B



C

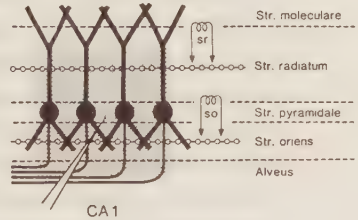


Abb. 12: Homosynaptische LTPs der CA1-Population

- A:** Darstellung der optisch (a...e) und elektrisch detektierten Antworten nach Stimulation des Stratum radiatum (sr, kleiner Pfeil) bzw. des Stratum oriens (so, großer Pfeil). Die Reizzeitpunkte sind zusätzlich durch die gepunkteten Linien gekennzeichnet.
- B:** Schema der Ortsauflösung des optisch erfaßten Arealen. Die Streifen a...e entsprechen den optischen Antworten unter A.
- C:** Topographie der untersuchten CA1-Population mit Position der Stimulationselektroden (sr, so) und der extrazellulären Mikroelektrode zur elektrischen Kontrollableitung. Das optisch erfaßte Areal ist grau hinterlegt.

4. Diskussion

Die Möglichkeit, neuronale Aktivität orts- und zeitaufgelöst nichtinvasiv zu erfassen, eröffnet neue Aspekte für das Verständnis komplexer zentralnervöser Vorgänge. Nachfolgend sollen das Verfahren der optischen Registrierung neuronaler Aktivität sowie die mit ihm erreichten Ergebnisse bei der Untersuchung funktioneller Aspekte der Langzeit- Potenzierung diskutiert werden. Darüber hinaus werden die momentanen Grenzen sowie die Perspektiven entsprechender optischer Verfahren aufgezeigt.

Ursprünglich konnten optische Verfahren aus methodischen Gründen nur zur Detektion von Aktionspotentialen an isolierten Riesenaxonen von Tintenfischen (*Loligo*) benutzt werden (Davila et al., 1973). Dieses in-vitro-Präparat besitzt ideale optische und elektrische Voraussetzungen für das neuartige Verfahren, denn es weist einen Axondurchmesser von ca. 1 mm auf und ist neuropilfrei. Obwohl es sich bei dieser ersten erfolgreichen Anwendung um eine nicht- ortsaufgelöste Erfassung lokaler Membranpotential-Änderungen handelte, erschienen die damit erreichbaren Möglichkeiten in Verbindung mit Verfahren der bildgebenden Mikroskopie offensichtlich. Nach der ersten optischen Ableitung von Aktionspotentialen an einzelnen Neuronen eines isolierten Invertebraten-Ganglienpräparates (Salzberg et al., 1973), folgte als nächster methodischer Schritt die erste ortsaufgelöste Messung an einem ähnlichen Präparat (Salzberg et al., 1977). Hier konnte mittels mehrerer, unter visueller Kontrolle individuell positionierter Photo-Detektoren die neuronale Aktivität bereits in 14 Zellen des oberen Schlundganglions der Entenmuschel (*Balanus nubilis*) simultan beobachtet werden. Der Soma-Durchmesser dieser Neurone beträgt 40 - 80 μm .

Zwischenzeitlich wird von verschiedenen Arbeitsgruppen die bildgebende Mikroskopie in Verbindung mit Matrix- Detektoren (Grinvald et al., 1981a; 1981b) unterschiedlicher Anzahl von Detektor-Elementen

eingesetzt. An verschiedenen Präparaten wurden dabei neurobiologische Fragestellungen untersucht, welche mit dem Instrumentarium der klassischen Elektrophysiologie schwer oder gar nicht zu beantworten sind:

- Bei kultivierten Neuroblastoma-Zellen konnte die Erregungsausbreitung beobachtet und die Leitungsgeschwindigkeit in Nervenfortsätzen von 2 μm Durchmesser ermittelt werden (Grinvald et al., 1981b).
- An Einzelneuronen von Invertebraten-Ganglien (*Balanus nubilus*) wurden dendritische Gebiete in-vitro differenziert, welche nach intrazellulärer Stimulation Aktionspotentiale generieren können (Krauthammer und Ross, 1984).
- Im semi-intakten Invertebraten-Präparat (*Aplysia*, *Navanax*) gelang es erstmals, verhaltenskorrelierte Aktivität an 46 Ganglien-Zellen gleichzeitig zu erfassen (London et al., 1987).
- Die Neurohypophyse des Krallenfrosches (*Xenopus*) wurde zur in-vitro-Untersuchung der neurosekretorischen Koppelung verwendet (Salzberg et al., 1983).
- Am olfaktorischen Cortex des Salamanders konnten in-vivo bis dahin unbekannte neuronale Organisations-Prinzipien gezeigt werden (Orbach et al., 1983).
- Erregungsausbreitung innerhalb einer umschriebenen Säugetier-Neuronenpopulation wurde am hippocampalen Hirnschnitt der Ratte mittels potentialsensitiver Absorption untersucht (Grinvald et al., 1982c).

- Visuell bzw. somatosensorisch evozierte neuronale Aktivität wurde am intakten Tectum des Frosches bzw. sensorischen Cortex der Ratte in-vivo demonstriert (Grinvald et al., 1984; Orbach et al., 1985).

Die vorliegende Arbeit geht über den bisherigen Einsatz des Verfahrens der optischen Erfassung neuronaler Aktivität in folgenden Punkten hinaus:

- Erstmals konnten **langanhaltende Änderungen** der synaptischen Transmission optisch registriert werden. Dazu bedurfte es neben der Kurzzeit-Stabilität der Ableiteinrichtung, welche zur Detektion der schnellen, potentialabhängigen optischen Signale erforderlich ist, stabiler Ableitungen im Stunden-Bereich.
- In Verbindung mit der erzielten Ortsauflösung gestattete diese Stabilität, reizinduzierte, räumlich diskrete **Langzeit-Effekte zu lokalisieren**. Das vorgestellte Verfahren scheint somit die bislang geeignetste Methode zur funktionellen Analyse dieses vermuteten elementaren Lernprozesses zu sein.
- An sämtlichen untersuchten Präparaten wurde extrinsische **potential-sensitive Fluoreszenz**, und nicht Absorption, zur Detektion der neuronalen Aktivität verwendet. Dies beruht im wesentlichen auf zwei Gründen: Fluoreszenz-Messungen erlauben deutlich niedrigere Farbstoff-Konzentrationen und vermindern somit die Wahrscheinlichkeit toxischer Reaktionen. Darüber hinaus erleichtern Fluoreszenz-Messungen den angestrebten Einsatz eines lasergestützten Systems (s. 4.4).

4.1. Eignung des optischen Verfahrens für Fragestellungen der experimentellen Neurophysiologie

Die Eignung des vorgestellten optischen Verfahrens zur Untersuchung neurobiologischer Probleme wurde nach zwei hauptsächlichen Kriterien bewertet. Einerseits hängt die grundsätzliche Eignung eines indirekten Meßverfahrens - wie es die hier verwendete optische Erfassung der elektrischen Phänomene der neuronalen Aktivität darstellt - von der **Äquivalenz** der indirekten mit den direkten Meßgrößen ab. Andererseits waren Langzeit-Kriterien zu erfüllen, wie **Stabilität** und **Toxizität** der verwendeten potentialsensitiven Farbstoffe: zwei Eigenschaften, die auch voneinander abhängig sein können.

- Äquivalenz der optischen und elektrischen Ableitungen

Sensitivität und Linearität sind bei indirekten Detektions-Verfahren die wichtigsten Äquivalenz-Parameter und bedürfen einer besonderen Betrachtung.

An neuronalen Membranen bestehen durch das Ruhemembranpotential (RMP, Größenordnung 100 mV) in Verbindung mit der Membrandicke (ca. 10 nm) hohe elektrische Feldstärken im Bereich von 10 MV/m. Bei schnellen physiologischen Änderungen dieses Potentials (z.B. Aktionspotentiale, APs) treten demzufolge Feldstärkeänderungen im Bereich von 10 GV/m·s auf. Diese extrem großen Transienten gaben früh zu der Vermutung Anlaß, daß hier Konformations-Änderungen der polaren Membranbausteine auftreten. Folglich müßten diese mittelbar über potentialabhängige **intrinsische** Veränderungen der mechanischen, thermischen und optischen Eigenschaften detektierbar sein (z. Überblick s. Watanabe, 1986). Untersuchungen zur Nutzbarkeit solcher intrinsischer optischer Effekte wie Doppelbrechung (B) oder Streuung (S) haben jedoch gezeigt, daß

kein linearer Zusammenhang zwischen elektrischen und optischen Parametern besteht (Cohen et al., 1968). Zudem waren selbst an "idealen" Präparaten mit sehr hohem neuronalen Membran- Anteil (z.B. isolierte Tintenfisch-Riesenaxone) nur sehr geringe potentialkorrelierte Änderungen der optischen Eigenschaften zu beobachten. Diese **Sensitivität** wird als relative Änderung der jeweiligen optischen Eigenschaft, bezogen auf eine definierte Potentialänderung, ausgedrückt ($\Delta B/B$ bzw. $\Delta S/S = 10^{-6}$ bis 10^{-5} für $\Delta U = 100$ mV).

Durch Beladung der Membranen mit potentialsensitiven Farbstoffen konnten zusätzliche optische Signale detektiert werden. Diese **extrinsischen** Effekte zeigten eine stark verbesserte Sensitivität und Linearität. Je nach molekularer Struktur zeigen diese Farbstoffe eine potentialabhängige Änderung der Absorption, Doppelbrechung, Fluoreszenz oder Streuung (z. Überblick s. Cohen et al., 1978; Grinvald, 1985; Salzberg, 1983). Die notwendigen Substanzkonzentrationen erstrecken sich dabei vom unteren Mikromol/l-Bereich bei Fluoreszenz-Farbstoffen bis hin zum unteren Millimol/l-Bereich bei Absorptions-Farbstoffen (Grinvald et al., 1982a; Gupta et al., 1981). Grundlegende Voltage-Clamp-Untersuchungen der extrinsischen Effekte wurden von Cohen an Krebs-Nerven und Tintenfisch-Riesenaxonen durchgeführt (Cohen et al., 1968). Dabei konnte eine klare Korrelation der extrinsischen optischen Signale zu Änderungen des transmembranalen Potentials gezeigt werden und keine Korrelation zu Änderungen des transmembranalen Stromes (vgl. Abb. 13.A). Diese Befunde wurden in weiteren Untersuchungen bestätigt und hinsichtlich der Proportionalität erweitert (Ross et al., 1977). Damit konnte die Linearität im gesamten physiologischen Bereich demonstriert werden (- 100 mV bis + 100 mV, s. Abb. 13.B). Die Sensitivität des Verfahrens verbesserte sich bei extrinsischen Signalen etwa um einen Faktor 100 gegenüber den intrinsischen.

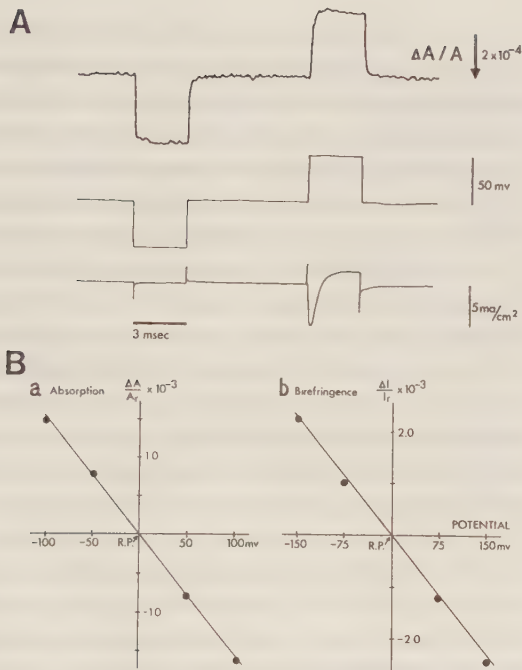


Abb. 13: Proportionalität der optischen Signale
(nach Ross et al., 1977)

- A:** Zeitlicher Verlauf der relativen Absorptions-Änderungen ($\Delta A/A$, oberste Spur) im Vergleich zum Membranpotential (mittlere Spur), welches durch Strominjektion (untere Spur) "geklemmmt" wurde.
- Ba:** Darstellung der relativen Absorptions-Änderungen in Abhängigkeit der Membranpotential-Änderungen. Der Pfeil kennzeichnet das Ruhe-Membranpotential.
- Bb:** Entsprechende Darstellung für Doppelbrechung.

In ähnlicher Weise wurde in der vorliegenden Arbeit die Äquivalenz von optischer und intrazellulär-elektrischer Kontroll-Registrierung am **Segmental-Ganglion des Blutegels** demonstriert (s. Abb. 6.). Die Proportionalität ist durch den gleichen Verlauf beider Spuren gekennzeichnet: die langsame Depolarisation bei Strominjektion, das Aktionspotential nach Erreichen der Schwelle und die darauf folgende Nachhyperpolarisation. Die Sensitivität ist durch einen Störabstand größer 2 in der ungemittelten Einzelantwort charakterisiert. Dieser Wert ist im Vergleich zu früheren Untersuchungen, die ebenfalls mittels potentialsensitiver Fluoreszenz an diesem Präparat durchgeführt wurden, deutlich erhöht (Grinvald et al., 1982a; Salzberg et al., 1973). Der Grund für diese Verbesserung kann nur in der apparativen Realisierung des Verfahrens zu suchen sein, da der gleiche potential-sensitive Farbstoff wie bei den Untersuchungen von Grinvald benutzt wurde (Grinvald et al., 1982a).

Neuronen-Populationen verlangen eine aufwendigere Äquivalenz-Betrachtung, da hier oft nur indirekte Vergleiche zwischen den optischen und den elektrischen Registrierungen möglich sind. Bei den untersuchten **hippocampalen Hirnschnitten** mußte die optische Ableitung jeweils mit klassischen Feldpotential-Registrierungen verglichen werden, also mit extrazellulären, räumlich summierten Einzelelektroden-Ableitungen der Populations-Aktivität (s. 1.1.). Hier muß beachtet werden, daß die Änderungen der optischen Signale im Rahmen der jeweiligen Ortsauflösung natürlich ebenfalls räumlich summiert sind. Jedoch äußern sich lokale Depolarisationen immer in einer Abnahme der lokalen Fluoreszenz, unabhängig vom Ort des Potentials. Dies steht im Gegensatz zu Feldpotential-Registrierungen und resultiert somit in Signalen, welche mit Begriffen der klassischen Elektrophysiologie als summierte transmembranale Potentiale zu beschreiben sind.

Bei komplexen Präparaten mit niedrigem relativen neuronalen Membran-Anteil, wie z.B. intakte Nerven, Ganglien- und Hirnschnittpräparate, sind unter bestimmten Voraussetzungen sehr große intrinsische optische Änderungen zu detektieren. Es handelt sich hierbei vermutlich im wesentlichen um gemischte optische Signale nicht-neuronalen Ursprungs, wie z.B. von Neuro-Glia, interstitiellen und vaskulären Strukturen. Diese Signale haben jedoch stark kompositen Charakter: sie sind zwar aktivitäts- aber nicht selektiv potentialkorreliert. So sind bei Transmissions- Messungen wie Absorption, Doppelbrechung oder Streuung, intrinsische Signale bis in den Prozent-Bereich beobachtet worden (Grinvald et al., 1986; Salzberg, 1985). Fluoreszenz-Messungen vermindern dieses Problem grundsätzlich signifikant auf Grund der potentialsensitiven Emission außerhalb des Exzitationsbereiches. Die durchgeführten Messungen wurden dementsprechend überprüft und mußten nicht dahingehend korrigiert werden.

- Stabilität der Farbstoffe

Die Synthese von Farbstoffen, die potentialsensitiv und im effektiven Konzentrationsbereich nicht toxisch sind, hat sich als aufwendiges Vorhaben erwiesen. Ausgehend von Farbstoffen, deren Affinität zu neuronalen Membranen aus der Histologie bekannt war, sind bislang mehrere tausend Substanzen synthetisiert worden (Grinvald et al., 1982a; 1982b), von denen sich weniger als 50 als geeignet erwiesen haben. Die zwischenzeitlich verfügbaren potentialsensitiven Farbstoffe lassen sich in zwei Klassen einteilen: Substanzen mit langsamem und Substanzen mit schnellem Antwortverhalten (Cohen et al., 1978; Waggoner und Grinvald, 1977).

Farbstoffe mit langsamem Antwortverhalten dringen in die Membranen ein und treten z.T. ins Cytosol über. Ihr optischer Mechanismus beruht auf einer potentialabhängigen Redistribution bzw. Akkumulation der polaren Farbstoffmoleküle an bzw. in der Zellmembran. Solche permeierenden Farbstoffe zeigen eine hohe Sensitivität (Prozent-Bereich), folgen jedoch den transmembranalen Potentialänderungen nur langsam (oberer Milli- bis Sekunden-Bereich). Diese Farbstoffe sind für neurobiologische Fragestellungen meist nicht geeignet. Bei Farbstoffen mit **schnellem Antwortverhalten** liegt der optische Mechanismus in der potentialabhängigen Änderung der Molekülstruktur. Solche nicht-permeierenden Substanzen lagern sich nur an die Membranen an. Sie zeigen eine erheblich geringere Sensitivität als permeierende Substanzen (10^{-3} bis 10^{-5}), folgen Potentialänderungen jedoch ungleich schneller (unterer Mikrosekunden-Bereich). Die Farbstoffe der Stry-Gruppe verbinden diese Eigenschaft mit hoher Fluoreszenz-Ausbeute; sie sind damit ideal und demzufolge für die vorliegende Untersuchung benutzt worden.

Bei der Registrierung von Langzeit-Effekten ist die **Stabilität** der verwendeten potentialsensitiven Farbstoffe von erhöhter Bedeutung. Grundsätzlich sind drei Gründe für ein instabiles Farbstoff-Verhalten zu diskutieren: Permeation, Hydrolyse und Photolyse. Nur im Falle der Permeation ändert sich dabei die statische Fluoreszenz nicht. Trotz des angewandten Korrektur-Algorithmus wird der Störabstand S/N in allen drei Fällen zunehmend reduziert (s. 2.4). Dies ist in Abb. 9, beim Vergleich der Original-Ableitungen 1 bis 5 zu erkennen.

Permeation spielt unter guten Ableitbedingungen nur eine untergeordnete Rolle, da die verwendeten Farbstoffe zu den nicht-permeierenden Substanzen der Stry-Gruppe gehören. Dies war bei den untersuchten Testvorparaten auf Grund der Zeitgröße deutlich zu

erkennen: Intakte, nur extern farbstoffbeladene Zellen erschienen als fluoreszierende Ringe und nicht als fluoreszierende Flächen. Letzteres wäre nach einer Permeation der Membran und einer Aufnahme ins Cytosol der Fall (s. Abb. 6.B. sowie Abb. 7.B.). Bei Zellen mit penetrationsbedingt veränderten Membraneigenschaften (niedriger Membran-Widerstand, niedriges Membran-Potential) dagegen war eine langsame Permeation zu beobachten. Bei längeren Experimenten (im Stunden-Bereich) ist - auch ohne Belichtung des Präparates - eine stetige Abnahme der Fluoreszenz und somit des Störabstandes S/N zu beobachten. Da dieser Effekt besonders bei ständig superfundierten Präparaten auftrat, dürfte es sich hier wohl mehr um ein Abwaschen als um eine echte **Hydrolyse** des Farbstoffes in der wäßrigen Organbad-Lösung handeln. Bei hoher Intensität der Präparat-Beleuchtung kommt es zu belichtungsinduzierten Veränderungen (**Photolyse**) der Farbstoffmoleküle. Solange sich diese Veränderung der Farbstoffmoleküle auf die Chromophore beschränkt (s. Photo-toxizität), wird die unmittelbare Folge ebenfalls nur eine Verminderung der Fluoreszenz-Intensität sein und damit eine Reduzierung des erreichbaren Störabstandes S/N. Hydrolyse und Photolyse kann durch diskretes oder kontinuierliches Nachfärben begegnet werden. Der diskrete Fall wird durch intermediäre Nachfärbephasen erreicht, während der kontinuierliche dem Verbleiben des Farbstoffes im Organbad entspricht (s. 2.3.). Allgemein wäre es anzustreben, die potentialsensitiven Substanzen während des Experimentes in der Badlösung zu belassen, da dies auch membranseitig eine zeitlich kontinuierliche Farbstoffverteilung ergäbe. Bei Absorptions-Farbstoffen ist das grundsätzlich nicht möglich, weil daraus eine hohe konzentrationsbedingte Absorption der Badlösung resultieren würde. Bei Fluoreszenz-Farbstoffen dagegen ist dies unter bestimmten Voraussetzungen möglich, zumal die hier verwendeten Substanzen erst im membrangebundenen Zustand nennenswert fluoreszieren (Grinvald et al., 1981). Meist erlaubt jedoch der hohe Substanzverbrauch bei

zirkulierenden Perfusionslösungen nicht dieses Verbleiben der potentialsensitiven Substanz. Wird die Perfusion während der Anfärbephase gestoppt, führt dies zu transienten hypoxischen Perioden, die auf Grund der vollständigen Erholung bei der Wiederaufnahme der Perfusion jedoch als tolerierbar eingestuft werden können (Fujiwara et al., 1987).

- Toxizität der Farbstoffe

Bei der Ausnutzung extrinsischer optischer Effekte sind toxikologische Betrachtungen der verwendeten potentialsensitiven Farbstoffe notwendig. Einerseits handelt es sich dabei um die Neurotoxizität der Substanzen selbst, andererseits um die Phototoxizität.

Bei den verwendeten Farbstoff-Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich (s. 2.3.) waren mit intrazellulären Kontrollableitungen bei Invertebraten- und Säugetier- Neuronen keine **neurotoxischen** Reaktionen zu beobachten. Nur zu Beginn der Anfärbephase traten z.T. transiente Ruhe-Membranpotential-Änderungen auf. Bei intensiver Beleuchtung der Farbstoffe in Anwesenheit von Sauerstoff kommt es unter bestimmten Voraussetzungen zu **phototoxischen** Effekten mit Entstehung von freien Radikalen. Diese ionisierten Molekülreste zeichnen sich durch ausgesprochene Aggressivität auch hinsichtlich biologischer Membranen aus, so daß es zu ausgedehnten Veränderungen der Membranstruktur in Verbindung mit Leckbildungen kommt. Die Folge davon sind Störungen des ionalen Zellmilieus, die als photodynamische Präparat-Schädigung bezeichnet werden (Salzberg et al., 1973). In der vorliegenden Untersuchung konnte dieser Effekt nur durch Dauerbelichtungen im hohen Sekunden-Bereich provoziert werden. Bei Einzelzell- Ableitungen waren dann Membranpotential-Änderungen elektrisch zu beobachten, veränderte Reizantworten waren sowohl

optisch als auch elektrisch detektierbar. Phototoxische Schädigungen konnten im Experiment durch routinemäßige Reduzierung der Belichtungsdauer auf die reinen Meßintervalle jedoch völlig ausgeschlossen werden, indem schnelle, elektronisch gesteuerte Photoverschlüsse verwendet wurden (s. 1.1. und 2.3.).

In der Anfangsphase des Einsatzes dieses optischen Verfahrens wurde durch die Verwendung von Substanzen, die zunächst nur auf Grund ihrer Affinität zu neuronalen Membranen ausgewählt wurden, die Problematik von der Sensitivität hin zur Toxizität verlagert. Entsprechend wurde die Überlebensdauer der Präparate bzw. der Ruhe- Membranpotential-Halbwertszeit als Maß für die Toxizität von potentialsensitiven Farbstoffen angegeben (z. Überblick s. Gupta et al., 1981). Um überhaupt zu nutzbaren Ableit-Zeiten (Gesamt-Belichtungsdauer plus präparatbedingte Interstimulations-Pausen) zu gelangen, wurden z.T. bei Invertebraten-Präparaten Organbädungen verwendet, aus denen der Sauerstoff durch Stickstoff-Begasung verdrängt war (Salzberg et al., 1973). Die erfolgreiche Synthese geeigneter Substanzen verlängerte diese nutzbaren Ableit-Zeiten, so daß sie zwischenzeitlich Dauer des Experimentes deutlich überschreiten.

4.2. Interpretation der optischen Signale am hippocampalen Schnittpräparat

Registrierungen der neuronalen Aktivität von Nervenzell-Populationen sind oft schwierig zu interpretieren. Dies gilt zunächst unabhängig von der Art des Verfahrens besonders bezüglich lokaler Potentialänderungen.

Für **Messungen ohne Ortsauflösung** ist dies beispielhaft in **Abb. 8.B** anhand der Repräsentation der präsynaptischen Aktivität sowohl im optischen als auch im elektrischen Signal zu erkennen. Hier ist auf Grund räumlicher Superposition die Depolarisation der afferenten Fasern nur schwer von der postsynaptischen Depolarisation und dem Beginn des Populations-Spikes zu separieren. Bei solchen Messungen ohne Ortsauflösung ist es meist nur pharmakologisch oder durch Änderung der Konzentration bestimmter Ionen möglich, prä- und postsynaptische Aktivität zu diskriminieren. Dieses Vorgehen wurde auch gewählt, um durch eine Unterscheidung der verschiedenen Komponenten den neuronalen Ursprung der optisch detektierten Signale zu verifizieren (s. 3.2.). In diesem Fall jedoch war, bei blockierter synaptischer Transmission durch Ca^{2+} -freie Badlösung, das afferente Summenaktionspotential im optischen Signal nur als relativ kleine Rest-Aktivität zu erkennen (**s. Abb. 9**). Dies ist der Tatsache zuzuschreiben, daß das optisch erfaßte Areal hier nur $250 \times 250 \mu\text{m}$ betrug und auf das Stratum pyramidale zentriert war. Somit lagen die rekrutierten afferenten Fasern im wesentlichen außerhalb dieses optischen Ableitfensters.

Für die weiteren Untersuchungen wurden deshalb **Messungen mit Ortsauflösung** (s. 1.1.) und ein vergrößertes optisch erfaßtes Areal ($500 \times 500 \mu\text{m}$, bzw. $400 \times 400 \mu\text{m}$) verwendet. Diese Erweiterung ist bei Anwendung klassischer elektrophysiologischer Verfahren nicht möglich. Mit diesem Schritt konnten die detektierten Signale mit der funktionellen Anatomie des hippocampalen Hirnschnitt-Präparates korreliert werden

(s. 1.2.). In Verbindung mit der eindeutigen Transformations-Beziehung (s. 3.2.) war es nun möglich, prä- und postsynaptische Aktivität direkt zu unterscheiden. Bei der Untersuchung der Erregungsausbreitung (s. 3.2.) wurde diese Diskriminierbarkeit deutlich: Der räumlich-zeitliche Verlauf der lokalen Depolarisationen spiegelte die funktionelle Anatomie (s. 1.2.) des Präparates wider (**s. Abb. 10**). Hier war keine Superposition von prä- und postsynaptischen Depolarisationen mehr festzustellen, obwohl die Signale zeitlich dispergiert sind. Der Grund für diese Afferenz-Dispersion ist einerseits im ausreichenden Abstand von Reizort und Ableitstelle, andererseits in der Zeit der Erregungsausbreitung innerhalb des jeweiligen Ableitstreifens (a...e) von 500 μm zu suchen.

4.3. Untersuchung funktioneller LTP-Effekte

In komplexen Nervensystemen von Säugetieren können funktionelle Aspekte von Langzeit-Potenzierungen der synaptischen Transmission nur durch räumliche Korrelation von Reiz- und LTP-Muster untersucht werden (s. 1.3.). Vorbedingung für einen solchen Ansatz war folglich ein Verfahren, mit dem langfristig Registrierungen bei ortsaufgelöster Detektion durchgeführt werden konnten.

Die erreichte Langzeit-Stabilität der optischen Methode (s. 3.2.) erlaubte es grundsätzlich, langanhaltende Modulationen des synaptischen Übertragungsverhaltens zu beobachten. Ohne Berücksichtigung der Ortskomponente gelang dies in einem ersten Schritt mit ausreichender Zeitauflösung. Die auf diese Weise untersuchten klassischen Langzeit-Potenzierungen - d.h. LTP-Effekte ohne Berücksichtigung lokaler Aspekte - zeigten die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Verfahrens, welche beide für die Aufnahme graduierter Reiz-Antwortkurven (**s. Abb. 11**) unabdingbar sind. Klassische Langzeit-Potenzierungen werden als Basis der Lern- und Gedächtnisfähigkeit des Zentralnervensystems angesehen (s. 1.3.).

Der entscheidende Schritt gelang in Erweiterung des Verfahrens, so daß lokale LTP-Effekte erstmals mit einer nichtinvasiven Methode langfristig untersucht werden konnten (s. 3.3.). Diese orts aufgelöst registrierte neuronale Aktivität wurde mit der funktionellen Anatomie (**s. Abb. 12c**) der Nervenzell-Population korreliert. Nach kurzer, hochfrequenter Reizung (tetanische Stimulation, s. 2.2.) unabhängiger Afferenzen waren bei Kontrollreizen langanhaltende, lokale Änderungen der neuronalen Aktivität zu beobachten. Während die präsynaptische Kontrollantwort unverändert blieb, war die offensichtliche Zunahme der postsynaptischen Kontrollantwort ausschließlich auf den jeweils tetanisierten afferenten Weg beschränkt (**s. Abb. 12A**). Dieser Erfolg der Tetanisierung ist vermutlich auf die gleichzeitige prä- und postsynaptische Aktivierung zurückzuführen. Obwohl dieses räumlich-zeitliche Zusammentreffen synaptischer Aktivität als erzwungen durch die verwendete tetanische Stimulation und damit als unphysiologisch betrachtet werden kann, bestätigt die resultierende homosynaptische Potenzierung dennoch das Postulat der benutzungsabhängigen synaptischen Plastizität (s. 1.3.). Die so demonstrierten homosynaptischen Langzeit-Potenzierungen werden als Modell eines elementaren, nicht-assoziativen Lernvorganges und somit als funktionelle LTP-Effekte angesehen.

4.4. Grenzen und Perspektive des Verfahrens

Das angewendete optische Verfahren hat die Limitierungen, welche bislang durch klassische elektrophysiologische Methoden gegeben waren, deutlich verschoben. Dies gilt besonders hinsichtlich der Invasivität und der Ortsauflösung. Die experimentellen Ergebnisse erreichen in ihrer Orts- und Zeitauflösung allerdings bislang nicht die theoretisch mögliche Grenze (s. 1.1.). Diese, vor allem bei der Ortsauflösung beobachteten, praktischen Limitierungen entstehen hauptsächlich durch die Anwendung klassischer

Photometrie in Verbindung mit realen, nicht-idealen Präparaten. Generell ist die Ortsauflösung im wesentlichen durch die Streulicht-, die Zeitauflösung durch die Rausch-Problematik begrenzt.

- Streulicht

Die Störung der optischen Ableitergebnisse, hervorgerufen durch Lichtstreuung am untersuchten Präparat, war in besonderem Maße bei Säugetier-Präparaten zu beobachten. Im Gegensatz zu Invertebraten-Präparaten erscheinen diese bereits bei makroskopischer Betrachtung opak. Das mikroskopseitige Streuverhalten (Spiegel, Linsen) ist demgegenüber vernachlässigbar.

Die Folgen dieser Licht-Streuung sind Begrenzungen der Ortsauflösung nicht nur in der x-y-Ebene, sondern auch in z-Richtung. Entgegen der unter idealen Bedingungen zu erwartenden theoretischen Schärfentiefe im unteren Mikrometer-Bereich werden hier praktische Werte im Bereich von mehreren 100 μm erreicht. Dieser Sachverhalt wird bei der dargestellten Ableitung eines sympathischen Neurons des Ganglions cervicale superior der Ratte (s. Abb. 7.) deutlich: Ein tieferliegendes, nicht visualisiertes Neuron wurde hier mit-erfaßt, wie aus Dauer, Schulter und Nachhyperpolarisation des optisch detektierten Potentials zu vermuten ist.

Abhilfe aus der Streulicht-Problematik kann nur ein Abbildungsverfahren mit sehr kleiner, außergewöhnlich scharf begrenzter Schärfentiefe im unteren Mikrometer- Bereich liefern. Die konsequente Anwendung des Prinzips der konfokalen Mikroskopie erscheint als eine sinnvolle Lösung (Minsky, 1951; Wilson, 1980). Bei diesem Verfahren ist die Punkt-Beleuchtung der Objektabtastung (s. 1.1.) mit einer Punkt-Detektion gekoppelt, d.h. nur Licht von dem aktuell beleuchteten Objektdetail erreicht den Photo- Detektor. Damit wird

erfolgreichen Anwendung des Verfahrens auf semi-intakte in-vitro- oder in-vivo- Präparate. Ein wesentlicher Schritt in diese Richtung scheint der Einsatz der Objektabtastung zu sein (Young und Roberts, 1951). Bei diesem Verfahren liegt die Problematik in der schnellen Positionierung des Lichtpunktes relativ zum Objekt. Die übliche Methode, das Objekt bei ruhendem Lichtpunkt zu bewegen (z. Überblick s. Wilson und Sheppard 1984) scheidet hier schon aus vielfältigen mechanischen Gründen aus, da z.B. hohe Beschleunigungen des Präparates bei positionierten Stimulations- und Ableit-Elektroden auftreten würden. Dagegen hat sich die schnelle Deflektion eines Lichtstrahles bei ruhendem Objekt mit verschiedenen Systemen als realisierbar erwiesen (Egger und Petran, 1967; Dillon und Morad, 1981; Saggau et al., 1984; s. **Abb. 14**). Die Positionierung des Lichtstrahles hat dabei im unteren Mikrosekunden-Bereich zu erfolgen. Dies resultiert aus der Ortsauflösung von 100 Punkten und der Frequenz-Bandbreite der zu detektierenden Signale (s. 2.4.). Ein derartiges Verfahren dürfte trotz technischer Schwierigkeiten die langfristig anzustrebende Methode sein, da sie in bezug auf Abbildungsgüte, Beleuchtungsausbeute, Flexibilität und Verarbeitungsaufwand als optimal erscheint.

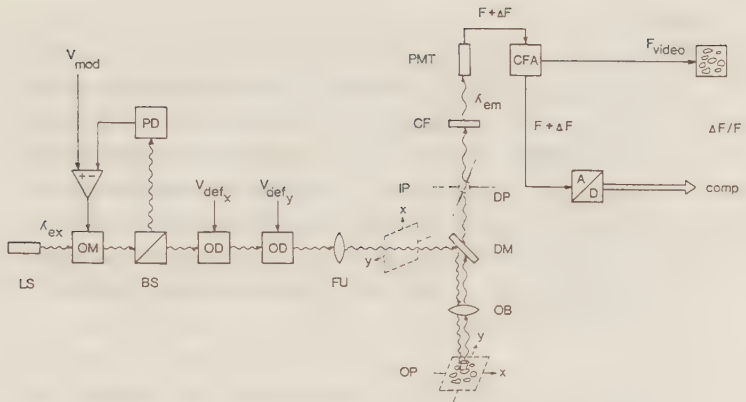


Abb. 14: Epifluoreszenz-Einrichtung zur optischen Erfassung neuronaler Aktivität mittels Objektabtastung

Laserlicht der Anregungswellenlänge λ_{ex} wird durch optische Deflektoren (OD) in x und y abgelenkt und mittels einer optischen Modulations-Einrichtung (BS, PD, OM) amplitudenstabilisiert. Der über die Fokussierungs-Einheit (FU) in das Mikroskop eingekoppelte Laserstrahl tastet das Präparat ab, welches sich in der Objektebene (OP) befindet. Der Photodetektor (PMT) erfährt die lokal emittierte Fluoreszenz λ_{em} .

Abkürzungen:	A/D: Analog/Digital-Wandler
	BS: Strahlteiler (Beam Splitter)
	CF: Sperrfilter (Cutoff Filter)
	CFA: Vorverarbeitungselektronik (Converter/Filter/Amplifier)
	DM: Strahlteiler-Spiegel (Dichroic Mirror)
	DP: Blende (Diaphragma)
	F: statische Fluoreszenz
	ΔF: dynamische Fluoreszenz
	IP: Zwischenbildebene (Image Plane)
	LS: Laser
	MB: Hg-Brenner (Mercury Burner)
	OB: Objektiv
	OM: Optischer Modulator
	OP: Objektebene (Object Plane)
	PD: Photo-Diode
	PMT: Photo-Multiplier (Photo Multiplier Tube)

- Rauschen

Eine Begrenzung der Zeitauflösung durch Rauschen ist auf allen Ebenen des Verfahrens möglich: die der Beleuchtungs-Einrichtung, der potentialsensitiven Farbstoffe und der Detektions-Einrichtung. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß sämtliche apparativen Rausch-Effekte grundsätzlich nur bis zur physikalisch bedingten, theoretischen Rauschgrenze optimiert werden können, was praktisch jedoch kaum realisierbar ist. Diese Grenze wird durch den Störabstand ($S/N \sim \sqrt{I}$) beschrieben (s. 2.4.).

Während diese theoretische Rauschgrenze eine möglichst hohe Anregungs-Intensität I verlangt, ist diese nur bei idealen, also beliebig stabilen **Beleuchtungs-Einrichtungen** sinnvoll. Die Grenzen für diese Beleuchtungs-Stabilität $\Delta I/I$ liegen momentan jedoch bei 10^{-4} (s. 2.3.). Ein Vergleich mit der Farbstoff-Sensitivität (s. 4.1.) läßt unter dieser Voraussetzung auch mit beliebig hohen Anregungs- Intensitäten bei ungemittelten Einzel-Antworten nur Störabstände S/N von 10 erwarten. Eine hochstabilisierte Laser-Beleuchtung erscheint auf Grund ihrer typischen hohen Leuchtdichte als die erfolgversprechendste Lösung (s. Objektabtastung). Mit der hier zwischenzeitlich ebenfalls erreichten Amplituden-Stabilität von 10^{-4} kann nun die maximale, biologisch tolerierte Anregungs-Intensität ausgenutzt werden. Abgesehen von dieser thermischen Limitierung durch das Präparat sind bei intensiver Beleuchtung auch molekulare Probleme zu beachten (s. 4.1, Farbstoff-Stabilität). Bei Laser-Beleuchtung tritt zusätzlich das sogenannte Kohärenz-Rauschen auf. Diese Störung ist auf die zeitliche Kohärenz (Phasen-Gleichheit) des Laserlichtes zurückzuführen. Dieser Rauschanteil läßt sich durch Fluoreszenz-Messungen reduzieren, da das emittierte Licht natürlich inkohärent ist.

Wesentlichster Faktor neben der Sensitivität ist bei den verwendeten **potentialsensitiven Farbstoffen** die Quanten-Effizienz der jeweiligen Substanz. Diese Größe gibt an, wieviele Photonen der Anregungs-Wellenlänge λ_{ex} absorbiert werden müssen, um ein Photon der Wellenlänge λ_{em} zu emittieren. Die Quanten-Effizienz beträgt bei den bislang kommerziell erhältlichen potentialsensitiven Substanzen ca. 20% und geht direkt in den Störabstand ein. Obwohl hier noch Verbesserungen zu erwarten sind, werden die Quanten-Effizienzen aus molekularen Gegebenheiten kaum über 40% liegen (Grinvald, 1982a; 1982b).

Auf der Ebene der **Detektions-Einrichtung** selbst sind zwei Größen für die Rausch-Problematik bedeutend: Dunkelrauschen und Quanten-Effizienz der Photo-Kathode. Bei der analogen Vorverarbeitung (s. 2.4.) ist demzufolge die Bandbreite der zu erfassenden bio-elektrischen Phänomene (unterer Kilohertz-Bereich) von entscheidendem Einfluß auf den erreichbaren Störabstand. Das Dunkelrauschen eines Photo-Detektors beruht auf thermisch bedingter Emission von Elektronen. Dieses Störsignal begrenzt bei kleiner Fluoreszenz-Intensität die Detektionsgrenze. Das Dunkelrauschen eines Photo-Multiplier ist kathodenbedingt deutlich niedriger als das einer Photo-Diode. Der naheliegende Weg einer möglichen Detektor-Kühlung bringt Probleme mit sich, wie z.B. zusätzliche optische Streuung durch Wasserdampf-Kondensation am Fenster für den Lichteintritt. Die Quanten-Effizienz eines Detektors beschreibt das Verhältnis von emittierten Elektronen zu absorbierten Photonen. Während Photo-Multiplier Quanten-Effizienten kaum über 10% zeigen, beträgt dieser Wert bei den verwendeten Photo-Dioden bis zu 80% und ist somit beinahe optimal. Das bedeutet, daß unter dem Gesichtspunkt der Rauschoptimerung bei ausreichender Lichtausbeute immer Photo-Dioden der Vorzug zu geben ist.

Zur Überwindung der momentanen Limitierung des Verfahrens bedarf es im wesentlichen Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der photo-metrischen Einrichtung sowie der potentialsensitiven Substanzen. Damit würden sich dann auch bislang verschlossene, weiterführende Anwendungsmöglichkeiten eröffnen, welche die optischen Erfassung der neuronalen Aktivität bei der neurophysiologischen Untersuchung elementarer Lernvorgänge bietet.

- Die Verwendung eines konfokalen Mikroskopes, welches auf einem im Amplitudenbereich hochstabilisierten Laser aufbaut, erscheint sinnvoll, da Orts- und Zeitauflösung dadurch verbessert werden können. Die damit erreichbare dreidimensionale Ortsauflösung würde die Anwendung des Verfahrens auf in-vivo-Präparate ermöglichen.
- Verbesserte potentialsensitive Substanzen könnten neben einer erhöhten Sensitivität eine durch gentechnische Methoden verbesserte Bindungsselektivität aufweisen. Dies würde die einfache, selektive Untersuchung von Neuronengruppen mit speziellen Membraneigenschaften ermöglichen.

4.5. Erreichte Ergebnisse und weiterführende Fragestellungen

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es, funktionelle Aspekte der Langzeit-Potenzierungen der synaptischen Plastizität mit einer neu zu entwickelnden, nichtinvasiven optischen Methode zu untersuchen. Diese Aufgabe wurde in einem schrittweisen Vorgehen erfüllt. Dazu wurde zunächst ein geeignetes optisches Verfahren entwickelt. Dann wurde seine Eignung für die experimentelle Neurophysiologie überprüft: beginnend mit Einzelzell-Ableitungen von einfachen Invertebraten-Ganglien (s. 3.1.) bis hin zur orts aufgelösten Messungen an Säugetier-Neuronen-Populationen

(s. 3.2.). Die hier erkannten Limitierungen gaben Anstoß zu laufenden Verbesserungen. Schließlich wurde dieses Verfahren zur Untersuchung funktioneller Aspekte der Langzeit-Potenzierung angewendet (s. 3.3.).

Eine weiterführende Fragestellung, die mit konventionellen elektro-physiologischen Methoden kaum befriedigend beantwortet werden kann, betrifft die mögliche Assoziativität von LTP-Effekten. Hierbei interessiert, ob es möglich ist, durch zwei räumliche Reizmuster entsprechende räumliche LTP-Muster zu induzieren. Methodisch muß dazu sowohl die verwendete lokale Stimulation als auch die lokale Detektion methodisch erweitert werden. Dies bedeutet einerseits, daß pro Reizmuster jeweils zwei Elektroden-Gruppen zur Stimulation unabhängiger Afferenzen benötigt werden (s. 1.3.). Unter Umständen könnte hierfür die prinzipiell demonstrierte Photo-Stimulationstechnik verwendet werden (Farber und Grinvald, 1983). Es handelt sich dabei um die Umkehrung des beschriebenen Photo-Detektionsverfahrens (s. 1.1.) durch Substanzen, welche dazu geeignet sind, neuronale Membranen beleuchtungsinduziert transient zu depolarisieren. Dies würde die Stimulation einzelner Neurone bzw. Neuronteile ermöglichen und somit erlauben, die räumlichen Reizmuster entscheidend zu verfeinern. Andererseits wird für diese erweiterte Fragestellung die zwischenzeitlich erreichte Auflösung von simultan 10 x 10 Ableitorten als Voraussetzung angesehen. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, die neuronale Aktivität mit der funktionellen Anatomie des Präparates (s. 1.2.) videotechnisch direkt in Verbindung zu setzen (Saggau und ten Bruggencate, 1988).

Die kürzlich demonstrierte Möglichkeit, unter Ausnutzung weiterer optischer Indikatoren gleichzeitig mit den Änderungen des Membranpotentials auch Transienten wichtiger intrazellulärer Ionenkonzentrationen (z.B. $[Ca^{2+}]_i$) nichtinvasiv zu bestimmen ist von weitreichender Bedeutung (Saggau et al., 1988). Damit würden sich dann auch bislang verschlossene,

weiterführende Anwendungsmöglichkeiten eröffnen, welche die optischen Erfassung der neuronalen Aktivität bei der neurophysiologischen Untersuchung elementarer zellulärer Lernvorgänge bietet.

Literatur

- Alger, B.E. and Teyler, T.J. (1976)
Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3 and dentate region of the rat hippocampal slice
Brain Res. 110, 463-480
- Andersen, P., Sundberg, S.H., Sveen O., and Wigström, H. (1977)
Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices
Nature 266, 736-737
- Andersen, P., Sundberg, S.H., Sveen O., Swann, J.W. and Wigström, H. (1980)
Possible mechanisms for long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices from guinea-pigs
J. Physiol. 302, 463-482
- Barrionuevo, G. and Brown, T.H. (1983)
Associative long-term potentiation in hippocampal slices
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7347-7351
- Bilkey, D.K. and Goddard V. (1986)
Long-term potentiation as a synaptic event
in: Jones, D.G. (Ed.)
Current Topics in Research on Synapses, Vol.3
Alan Liss, New York, 1-27
- Bliss, T.V.P. and Gardner-Medwin, A.R. (1973)
Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant pathway
J. Physiol. 232, 357-374
- Bliss, T.V.P. and Lømo, T. (1973)
Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant pathway
J. Physiol. 232, 331-356
- Brodal, A. (1981)
Neurological anatomy in relation to clinical medicine
Oxford Univ. Press, New York, 673 ff

- Creager, R., Dunwiddie, T. and Lynch, G. (1980)
Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus
J. Physiol. 299, 409-424
- Cohen, L.B., Keynes, R.D. and Hille, B. (1968)
Light scattering and birefringence changes during nerve activity
Nature 218, 438-441
- Cohen, L.B. and Salzberg, B.M. (1974)
Optical measurement of membrane potential
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 83, 35-88
- Cohen, L.B., Salzberg, B.M. and Grinvald, A. (1978)
Optical methods for monitoring neuron activity
Ann. Rev. Neurosci. 1, 171-182
- Collingridge, G.L. and Bliss, T.V.P. (1987)
NMDA receptors - their role in long-term potentiation
Trends in Neurosci. 10, 288-293
- Curtis, D.R. and Eccles, J.C. (1960)
Synaptic action during and after repetitive stimulation
J. Physiol. 150, 374-398
- Davila, H.V., Salzberg, B.M., Cohen, L.B., Waggoner, A.S., (1973)
A large change in axon fluorescence that provides a promising method for measuring membrane potential
Nature New Biol. 241, 159-160
- Dillon, S. and Morad, M. (1981)
A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart
Science 214, 453-456
- Dingledine, R. (Ed.) (1984)
Brain Slices
Plenum Press, New York and London

- Dingledine, R., Dodd, J. and Kelly, J.S. (1980)
 The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording
J. Neurosci. Meth. 2, 323-362
- Disterhoft, J.F., Coulter, D.A. and Alkon, D.L. (1986)
 Conditioning-specific membrane changes of rabbit hippocampal neurons measured in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 2733-2737
- Dunwiddie, T. and Lynch, G. (1978)
 Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency
J. Physiol. 276, 353-367
- Eccles, J.C. (1964)
 The physiology of synapses
 Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Eccles, J.C. (1983)
 Calcium in long-term potentiation as a model for memory
Neurosci. 10, 1071-1081
- Egger, M.D. and Petran, M. (1967)
 New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion gells
Science 157, 305-307
- Farber, I. and Grinvald, A. (1983)
 Identification of presynaptic neurons by laser photostimulation
Science 222, 1025-1027
- Fujiwara, N., Higashi, H., Shimigiji, K. and Yoshimura, M. (1987)
 Effects of hypoxia on rat hippocampal neurones in vitro
J. Physiol. 384, 131-151

- Grinvald, A. (1985)
Real-time optical mapping of neural activity: from single growth cones to the intact mammalian brain
Ann. Rev. Neurosci. 8, 263-305
- Grinvald, A., Anglister L., Freeman, A., Hildesheim, R., and Manker, A. (1984)
Real-time optical imaging of naturally evoked electrical activity in intact frog brain
Nature 308, 848-850
- Grinvald, A., Cohen, L.B., Leshner, S. and Boyle, M.B. (1981a)
Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array
J. Neurophysiol. 45, 829-839
- Grinvald, A., Hildesheim, R., Farber, I.C. and Anglister L. (1982a)
Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential
Biophys. J. 39, 301-308
- Grinvald, A., Hildesheim, R., Pine, J. and Cohen, L.B. (1982b)
Kits of voltage-sensitive fluorescent probes for external or iontophoretic staining of central-nervous-systems or single neurons
Biol. Bull. 163, 383-384
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D. and Wiesel, T.N. (1986)
Optical mapping of cortical activity without voltage-sensitive dyes
Neurosci. Abstr., 405.12, 1499
- Grinvald, A., Manker, A. and Segal, M. (1982c)
Visualization of the spread of activity in rat hippocampal slices by voltage sensitive optical probes
J. Physiol. 333, 269-291
- Grinvald, A., Ross W.N., and Farber, I.C. (1981b)
Simultaneous optical measurement of electrical activity from multiple sites on processes of cultured neurons
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3245-3249

- Gupta, R.K., Salzberg, B.M., Grinvald, A., Cohen, L.B., Kamino, K., Leshner, S., Boyle M.B., Waggoner, A.S. and Wang, C.H. (1981)
Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential
J. Membr. Biol. 58, 123-137
- Hebb, D.O. (1949)
The Organization of Behaviour
Wiley, New York
- Isaacson, R.L. (1982)
The Limbic System, 2nd Ed.
Plenum, New York & London
- Ito, K., Miakawa, H. and Kato, H. (1966)
The long-term facilitation of neural activity produced by repeated pairing of an orthodromic stimulus and antidromic stimuli in the sliced hippocampal formation
Tohoku J. Exp. Med. 150, 229-230
- Jefferys, J.G.R. (1981)
The vibroslice, a new vibrating blade tissue slicer
J. Physiol. 324, 2P
- Kandel, E.R. and Spencer, W.A. (1968)
Cellular neurophysiological approaches to the study of learning
Physiol. Rev. 48, 65-134
- Kelso, S.R. and Brown, T.H. (1986)
Differential conditioning of associative synaptic enhancement in hippocampal brain slice
Science 232, 85-87
- Kelso, S.R., Ganong, A.H. and Brown, T.H. (1986)
Hebbian synapses in hippocampus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5326-5330
- Krauthammer, V. and Ross, W.N. (1984)
Regional variations in excitability of barnacle neurons
J. Neurosci. 4, 673-682

- Landgren, S., Phillips, C.G. and Porter, R. (1962)
Minimal synaptic actions of pyramidal impulses on some alpha motoneurons of the Baboon's hand and forearm
J. Physiol. 161, 91-138
- Lloyd, D.C.D. (1949)
Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of the spinal cord
J. Gen. Physiol. 33, 147-170
- Lómo, T. (1970)
Some properties of a cortical excitatory synapse
in: Andersen, P. and Jansen, J.K.S (Eds.)
Excitatory Synaptic Mechanisms
Universitetsforlaget, Oslo, Sweden, 207-211
- London, J.A., Zecevic, D. and Cohen L.B. (1987)
Simultaneous optical recording of activity from many neurons during feeding in Navanax
J. Neurosci. 7, 649-661
- Lorente de Nó, R. (1934)
Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the studies of the ammonic system
J. Psychol. Neurol. 46, 113-177
- Lynch, G.S., Dunwiddie, T.V. and Gribkoff, V.K. (1977)
Heterosynaptic depression: a post-synaptic correlate of long-term potentiation
Nature 266, 737-739
- Lynch, G.S. and Schubert, P. (1980)
The use of in vitro brain slices for multidisciplinary studies of synaptic function
Ann. Rev. Neurosci. 3, 1-22
- Lynch, M.A., Errington, M.L. and Bliss T.V.P. (1985)
Long term potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus. Increased Release of ^{14}C glutamate without increase in receptor binding
Neurosci. Lett. 62, 123-129

MacLean, P.D. (1970)

The triune brain, emotion and scientific bias

in: Schmitt, F.O. (Ed.)

Intensive Study Program in the Neurosciences,

Neuroscience Research Program, 23, 336

Rockefeller University Press, New York

Marr, D. (1968)

A theory of cerebellar cortex

J. Physiol. 202, 437-470

Minsky, M. (1957)

Microscopy apparatus

US Patent 3013467

Misgeld, U., Sarvey, J.M. and Klee, M.R. (1979)

Heterosynaptic postactivation in hippocampal CA3 neurons: long term changes of postsynaptic potentials

Exp. Brain Res. 37, 217-229

Mitzdorf, U. (1985)

Current source-density method and application in cat cerebral cortex investigation of evoked potentials and EEG phenomena

Physiol. Rev. 47, 965-974

Novak, J.L. and Wheeler, B.C. (1988)

Multisite hippocampal slice recording and stimulation using a 32 element micro-electrode array

J. Neurosci. Meth. 23, 149-159

Orbach, S.H. and Cohen L.B. (1983)

Optical monitoring of activity from many areas of the in vitro and in vivo Salamander olfactory bulb. A new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system

J. Neurosci. 3, 2251-2262

- Orbach, S.H., Cohen L.B. and Grinvald, A. (1985)
Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex
J. Neurosci. 5, 1886-1895
- Pawlow, I.P. (1927)
Conditioned Reflexes
Oxford
- Ramón y Cajal, S. (1893)
Über die feinere Struktur des Ammonshorns
Z. wiss. Zool. 56, 615-663
- Rose, G.M., Diamond, D.M., Pang, K. and Dunwiddie T.V. (1988)
Primed burst potentiation: lasting synaptic plasticity invoked by physiologically patterned stimulation
in: Haas, H.L. and Buzsaki, G. (Eds.)
Synaptic Plasticity in the Hippocampus
Springer, Berlin, 159-162
- Rosenzweig, M.R. and Leimann, L. (1982)
Physiological psychology
D.C. Heath & Comp., Lexington MA
- Ross, W.N., Salzberg, B.M., Cohen, L.B., Grinvald, A., Davila, H.V.,
Waggoner, A.S and Wang, C.H. (1977)
Changes in absorption, fluorescence, dichroism and birefringence in stained giant axons: optical measurement of membrane potential
J. Membr. Biol. 33, 141-183
- Saggau, P. and ten Bruggencate, G. (1987)
Local long-term potentiation in hippocampal CA1- populations monitored by optical recording of neural activity
Pflügers Arch. 408, Suppl.1, R59

- Saggau, P. and ten Bruggencate, G. (1988)
 Topology-related real-time monitoring of neural activity in hippocampal brain slices by noninvasive optical recording - a step towards functional aspects of long-term potentiation (LTP)
 in: Haas, H.L. and Buzsaki, G. (Eds.)
 Synaptic Plasticity in the Hippocampus
 Springer, Berlin, 159-162
- Saggau, P., Galvan M., Rucker, F. und Unsöld, E. (1984)
 Erfassung neuronaler Aktivität mit optischen Methoden
 in: Waidelich, W. (Ed.)
 Optoelectronics in Medicine
 Springer, Berlin, 233-238
- Saggau, P., Galvan, M. and ten Bruggencate, G. (1986a)
 Spread of excitation and long-term potentiation in hippocampal brain slices monitored by optical recording of neural activity
 Pflügers Arch. 406, Suppl., R12
- Saggau, P., Galvan, M. and ten Bruggencate, G. (1986b)
 Long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices monitored by optical recording of neural activity
 Neurosci. Lett. 69, 53-58
- Saggau, P., Sheridan, R.D. and Ogura, A. (1988)
 Simultaneous recording of calcium and voltage changes in hippocampal slices using selective optical probes
 Europ. J. Neurosci. 1, Suppl., 14.5
- Salzberg, B.M. (1983)
 Optical recording of electrical activity in neurons using molecular probes
 in: Barker, J.L. and McKelvy, J.F. (Eds.)
 Electrophysiological and Optical Recording Techniques
 Current Methods in Cellular Neurobiology, Vol.III
 Wiley, New York, 139-180

- Salzberg, B.M., Grinvald, A., Cohen, L.B., Davila, H.V. and Ross, W.N. (1977)
Optical recording of neural activity in an invertebrate central nervous system:
simultaneous monitoring of several neurons
J. Neurophysiol. 40, 1281-1291
- Salzberg, B.M., Obaid, A.L. and Gainer, M. (1985)
Large and rapid changes in light scattering accompany secretion by the nerve terminals
in the mammalian neurohypophysis
J. Gen. Physiol. 86, 395-411
- Salzberg, B.M., Obaid, A.L., Senseman, D. and Gainer, M. (1983)
Optical recording of action potentials from vertebrate nerve terminals using
potentiometric probes provides evidence for sodium and calcium components
Nature 306, 36-39
- Sastry, B.R., Goh, J.W. and Auyeung, A (1986)
Associative induction of posttetanic and long-term potentiation in the CA1 neurons
of rat hippocampus
Science 232, 988-990
- Schwartzkroin, P.A. and Wester, K. (1975)
Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro
hippocampal slice
Brain Res. 89, 107-119
- Siman, R., Baudry, M. and Lynch, G. (1985)
Regulation of glutamate receptor binding by the cytoskeletal protein fodrin
Nature 313, 225-228
- Swanson, T.J., Teyler, T.J. and Thompson, R.F. (1982)
Hippocampal long-term potentiation: mechanisms and implications for memory
Neurosci. Res. Progr. Bull. 20, 611-769
- Teyler, T.J. (1980)
Brain slice preparation: Hippocampus
Brain Res. Bull. 5, 391-403

- Teyler, T.J. and DiScenna, P. (1984)
The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function
Brain Res. Bull. 12, 711-719
- Teyler, T.J. and DiScenna, P. (1985)
The role of the hippocampus in memory: a hypothesis
Neurosci. Biobehav. Rev. 9, 377-389
- Teyler, T.J. and DiScenna, P. (1987)
Long-term potentiation
Ann. Rev. Neurosci. 10, 131-161
- Thompson, R.F., Berger, T.W. and Madden, J. (1983)
Cellular processes of learning and memory in the mammalian CNS
Ann. Rev. Neurosci. 6, 447-491
- Tsukahara, N. (1981)
Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system
Ann. Rev. Neurosci. 4, 351-379
- Waggoner, A.S. and Grinvald, A. (1977)
Mechanisms of rapid optical changes of potential sensitive dyes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 303, 217-241
- Watanabe, A. (1986)
Mechanical, thermal, and optical changes of the nerve membrane associated with excitation
Japan. J. Physiol. 36, 625-643
- Wenzel, J., Schmidt, C., Duwe, G., Skrubitzki, W.G. und Kudrjatschow, J. (1986)
Stimulations-induzierte Veränderungen der Ultrastruktur von Synapsen im Hippocampus während posttetanischer Potenzierung
J. Hirnforschung 26, 573-583
- Wigström, H. and Gustafsson, B. (1983)
Heterosynaptic modulation of homosynaptic long-lasting potentiation in the hippocampal slice
Acta Physiol. Scand. 119, 455-458

- Wilson, T. (1980)
Image properties and applications of scanning optical microscopes
Applied Physics 22, 119-128
- Wilson, T. and Sheppard, C. (1984)
Theory and practice of scanning optical microscopy
Academic Press, London
- Yamamoto, C. and Cujo, T. (1978)
Long-term potentiations in thin hippocampal sections studied by intracellular and extracellular recording
Exp. Neurol. 58, 242-250
- Yamamoto, C. and McIlwain, H. (1966)
Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically defined media in vitro
J. Neurochem. 13, 1333-1343
- Young, J.Z. and Roberts, F. (1951)
A flying spot microscope
Nature 157, 231

Danksagung

Für die vorliegende Arbeit bin ich Vielen zu Dank für ihre Unterstützung verpflichtet.

Für Betreuung und Ansporn über die Jahre hinweg danke ich Herrn Prof. G. ten Bruggencate.

Für die Einführung in das experimentelle Arbeiten an Hirnschnitt-Präparaten danke ich meinem Kollegen Priv.-Doz. M. Galvan.

Meinen technischen Mitarbeitern W. Badke, F. Hahn, K. Heiler, G. Holzmann, R. Hiendl, F. Rucker und G. Wenzel sowie der Feinmechanischen Instituts- Werkstatt möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Ohne ihre unermüdliche Mitarbeit bei der Lösung der methodischen Probleme wäre das experimentelle Vorhaben technisch nicht durchführbar gewesen.

Für die konstruktive Durchsicht des Manuskriptes danke ich Prof. P. Grafe und, darüber hinaus für viele fruchtbare Diskussionen, ganz besonders meinem Kollegen Priv.-Doz. F. Kolb.

Der letzte und doch der größte Dank gehört meiner Frau, die sehr oft auf gemeinsame Erlebnisse verzichten mußte.

Lebensdaten

Geboren am 30.9.1949 in Brannenburg/Inn
seit 31.5.1981 verheiratet mit Renate Weick
wohnhaft in 8224 Chieming

1955 - 1960	Grundschule, Volksschule am Kornhaus, Ulm/Donau
1960 - 1968	Gymnasium, Kepler-Gymnasium, Ulm/Donau
1968	Abitur
1968 - 1969	Praktikum, AEG-Telefunken, Ulm/Donau
1969 - 1973	Studium der Nachrichtentechnik, FH-Ulm
1973	Diplom, Dipl.-Ing.(FH)
1973 - 1977	Studium der Kybernetik, TU-München
1977	Diplom, Dipl.-Ing.
1977- 1978	Freier Mitarbeiter, Deutsches Herzzentrum München
1977 - 1978	Wiss. Hilfskraft, Physiol. Inst. d. Univ. München
1978 - 1981	Wiss. Assistent, Physiol. Inst. d. Univ. München
1981 - 1986	Akad. Rat, Physiol. Inst. d. Univ. München
1984 -	Teilprojektleiter im Sonderforschungsbereich 220 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Physiol. Inst. d. Univ. München
1987 -	Wiss. Mitarbeiter, Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Physiol. Inst. d. Univ. München

